



UUSIEN STEROIDEJA SITOVIENT AVIDIINI- MUTANTTIEN TUOTTO JA KARAKTERISOINTI

Niklas Kähkönen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2011
Laboratorioala
Laboratorioanalyttikko
Tampereen ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioala

NIKLAS KÄHKÖNEN: Uusien steroideja sitovien avidiinimutanttien tuotto ja karakterisointi

Opinnäytetyö 92 sivua, liitteet 12 sivua
Joulukuu 2011

Homotetrameerinen avidiini-proteiini tunnetaan sen huomattavan korkeasta affiniteetista ligandiinsa biotiiniin. Korkean affiniteetin lisäksi avidiini on proteiinina poikkeuksellisen kestävä ulkoisia voimia vastaan. Ensiluokkainen kestävyys ja korkea affiniteetti ligandia kohtaan tekevät avidiinista mielenkiintoisen tutkimuskohteen eri sovelluksiin. Avidiinin ligandinsitomista on tutkittu runsaasti ja proteiinia on muokattu niin kemiallisesti kuin geneettisesti. Muokkaamalla avidiinin ligandinsitomispaikkaa on saatu aikaan steroideja sitovia avidiinimutanteja, joiden affiniteetti biotiinille on vähentynyt.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli tutkia kahdelle uudelle steroideja sitoville avidiinimutanteille tehtyjen pistemutaatioiden vaikutusta proteiinin tuottoon, lämpöstabiiliuteen ja ligandin sitomisaffiniteettiin. Pistemutaatiot olivat muutos isoleusiinista tyrosiiniksi kohdassa 117 (I117Y) tai asparagiinista asparagiinihapoksi kohdassa 118 (N118D). Proteiinit tuotettiin pullokasvatuksina *Escherichia coli* -solujen periplasmiseen tilaan ja puhdistettiin affiniteettikromatografisesti nikkeli-sefaroosi-matriisilla ja puhtautta arvioitiin geelielektroforeesilla. Proteiinien aktiivisuutta ja stabiilisuutta karakterisoitiin geelisuodatuksen avulla ja kalorimetrisin kokein niin differentiaalisella pyyhkäisykalorimetrialla kuin isotermisellä titrauskalorimetriallakin.

Pistemutatuja avidiinimutanteja saatiin tuotettua liukoisena ja aktiivisessa tetrameerisessä muodossaan. Proteiinit ekspressoituivat erittäin hyvin. N118-pistemutantin havaittiin suosivan testosteronin sitoutumista verrattuna progesteroniin, mutta sen lämpöstabiiliuteetti oli alentunut. I117Y-pistemutantin tuotto oli selkeästi N118D-pistemutanttia parempaa. I117Y-pistemutaation vaikutus proteiinin lämpöstabiiliuteen oli huomattava. Ligandinsitomisaffiniteetteja ei onnistuttu luotettavasti määrittämään titrauskalorimetrialla, mutta affiniteetti biotiinia kohtaan näytti selvästi heikenneen kaikilla proteiinimutanteilla.

Uusista pistemutaatioista avidiinin steroideja sitoviin mutanteihin saatiin paljon hyödyllistä tietoa proteiinien toiminnan kannalta. Tulevaisuudessa voitaisiin selvittää molempien pistemutaatioiden toiminta yhdessä. Lisäksi affiniteetti eri ligandeja kohtaan tulisi määrittää joko eri olosuhteissa tai eri menetelmällä.

Avainsanat: avidiini, steroidi, proteiinin muokkaus, lämpöstabiiliuteetti, sitoutumisaffiniteetti, kohdennettu mutageneesi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Sciences

NIKLAS KÄHKÖNEN: The Production and Characterization of Novel Steroid-Binding Avidin Mutants

Bachelor's Thesis 92 pages, appendices 12 pages
December 2011

The homotetrameric avidin protein is well-known for its extremely high affinity towards biotin. In addition, the protein exhibits exceptional stability in varying conditions. The protein's high ligand-binding affinity and stability makes avidin an interesting subject for research. The ligand-binding of avidin has been thoroughly investigated and the protein has been modified chemically and genetically for research purposes. By modifying the ligand-binding site of avidin, novel steroid-binding avidins exhibiting lower biotin-affinity have been manufactured.

The purpose of this Bachelor's Thesis was to collect information on the effects of the introduced point mutations from isoleucine to tyrosine at location 117 (I117Y) and from asparagine to aspartic acid at location 118 (N118D) to the ligand-binding affinity, thermal stability and the production of two novel steroid-binding avidin mutants. The proteins were expressed to the periplasmic space of *Escherichia coli* cells and produced as batch cultures in Erlenmeyer flasks. Purification was carried out by affinity chromatography using a nickel sepharose matrix and the overall purity of the proteins was assayed with gel electrophoresis. The measurements for protein activity and stability were conducted using gel filtration and calorimetry. The calorimetric tools used were: differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry.

The study indicated it was possible to produce the point-mutated avidins both in soluble and active tetrameric form. The quantity of the expressed protein exceeded the needs for the thesis work. The results indicated the N118D-mutant favored the binding of testosterone over progesterone but its thermal stability had decreased. According to expectations, the I117Y-mutant showed increased thermal stability and the overall yield of the protein was greater than that of the N118D-mutant. Isothermal titration calorimetry failed to produce reliable binding affinities to all the protein ligand combinations but suggested lower binding affinity towards biotin.

The information gathered through this Bachelor's Thesis proved highly valuable in understanding the functions of the novel steroid-binding avidins. For future research, co-operation of both the mutations studied could be assayed. The affinity towards the different ligands could be achieved using different methods or changing the measurement conditions.

Key words: avidin, steroid, protein modification, thermal stability, binding affinity, site-directed mutagenesis

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	5
2 AVIDIINI JA BIOTIINI	6
2.1 Avidiini	6
2.2 Avidiinin rakenne	7
2.3 Biotiini	10
2.4 Avidiini-biotiini-kompleksi	11
2.4.1 Biotiinin sitoutuminen avidiiniin	11
2.4.2 Biotiinin tunnistaminen ja tärkeät tähteet	12
2.4.3 Avidiini-biotiini-teknologia ja pienligandien sitominen	14
2.5 Testosteroni ja progesteroni	15
3 REKOMBINANTTIPROTEIINIEN TUOTTO, PUHDISTUS JA KARAKTERISOINTI	17
3.1 <i>Escherichia coli</i> tuotto-organismina	17
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	17
3.1.2 Avidiinin tuottaminen <i>E. coli</i> -soluissa	18
3.2 Tuoton vaiheet	19
3.2.1 Vektori ja insertti	19
3.2.2 Transformaatio kompetentteihin soluihin ja selektio	20
3.2.3 Tuotteen ekspressio	21
3.2.4 Viljeltävät solut	22
3.3 Tuotteen puhdistus	22
3.3.1 Homogenisointi	22
3.3.2 Differentiaalisentrifugointi	24
3.3.3 Affiniteettikromatografia	25
3.3.4 Immobilisoitu metallaaffiniteettikromatografia	26
3.3.5 Dialyysi	29
3.4 Tuotteen karakterisointi	30
3.4.1 Geelielektroforeesi	30
3.4.2 Proteiinien visualisointi	33
3.4.3 Western blot	34
3.4.4 Geelisuodatus	36
3.4.5 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria	37
3.4.6 Isoterminen titrauskalorimetria	40
4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET	43

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	44
5.1 Aineisto ja lähtökohdat kokeelliselle osalle	44
5.2 Työn suorituksen kuvaus	47
5.3 Transformaatio <i>E. coli</i> -soluihin ja proteiinin ekspressio	48
5.4 Proteiinin puhdistuksen vaiheet	49
5.4.1 Sentrifugointi ja homogenisointi	49
5.4.2 Affiniteetikromatografinen puhdistus nikkeli-sefaroosilla	50
5.5 Puhdistuksen seuranta SDS-PAGE:lla ja western blot	50
5.6 Proteiinkonsentraation laskeminen	52
5.7 Proteiinin oligomeerisyyden määrittäminen geelisuodatuksella	53
5.8 Differentiaaliset pyyhkäisykalorimetriakokeet	54
5.9 Isotermiset titrauskalorimetriakokeet	55
6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU	56
6.1 Proteiinin tuotto ja puhdistus	56
6.2 Geelisuodatustulokset	61
6.3 Pyyhkäisykalorimetriatulokset	65
6.4 Titrauskalorimetriatulokset	71
7 PÄÄTÄNTÖ	74
LÄHTEET	76
LIITTEET	81

LYHENTEET

6xHis	polyhistidiinipuhdistuskahva
α -Avd	polyklonaalinen kanin vasta-aine avidiinille
A	absorbanssi
amp _r	ampisilliiniresistenssi
AP	alkalinen fosfataasi
APS	ammoniumpersulfaatti
Avd	avidini
BCIP	5-bromi-4-kloori-3'-indolifosfaatti
Btn	biotini
Da	dalton
DNA	deoksiribonukleiinihappo
DSC	differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GAR-AP	polyklonaalinen vuohen vasta-aine kanille, jossa konjugoituna AP
GF	geelisuodatus
<i>H</i>	entalpia
IMAC	immobilisoitu metalliaffiniteettikromatografia
IPTG	isopropyyl β -D-tiogalaktosidaasi
ITC	isoterminen titrauskalorimetria
K_B	sitoutumisvakio
K_d	dissosiaatiovakio
LB	lysogeny broth -elatusliemi
L1	liukoinen supernatanttinäyte
<i>M</i>	molekyyli massa
MCS	polylinkkerialue
<i>n</i>	stoikiometrinen arvo
NBT	nitrosinitetratsolium
oriC	replikaation aloituskohta
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
Pro	progesteroni
<i>S</i>	entropia
<i>S</i>	sakkanäyte
sAvd	streptavidini
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
SOC	super optimal broth with catabolite repression -elatusliemi
T_c, T_g, T_m	kristalloitumis-, lasittumis- ja sulamispiste
<i>T</i>	totaalinäyte
TBS	Tris-puskuroitu suolaliuos
TEMED	N,N,N',N'-metyylietyylidiamiini
Tes	testosteroni
tet _r	tetrasykliiniresistenssi

Aminohapot

A, Ala	alaniini
C, Cys	kysteiini
D, Asp	asparagiinihappo
E, Glu,	glutamiinihappo
F, Phe,	fenyylialaniini
G, Gly,	glysiini
H, His	histidiini
I, Ile	isoleusiini
K, Lys	lysiini
L, Leu,	leusiini
M, Met	metioniini
N, Asp	asparagiini
P, Pro	proliini
Q, Gln	glutamiini
R, Arg	arginiini
S, Ser	seriini
T, Thr	treoniini
W, Trp	tryptofaani
V, Val	valiini
Y, Tyr	tyrosiini

1 JOHDANTO

Avidiini on proteiini, joka kestää erittäin vaativia olosuhteita. Sen säilyvyys ja kyky sitoa ligandiaan biotiinia suurella affiniteetilla tekevät proteiinista mielenkiintoisen tutkimuskohteen. Vahvaa interaktiota proteiinin ja sen ligandin välillä voidaan hyödyntää bioteknologisissa sovelluksissa monin tavoin. Muokkaamalla proteiinin ligandinsitomista puoltamaan toisiakin ligandeja mahdollisuudet eri teknologioiden käyttöön runsastuvat entisestään.

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston biolääketieteellisen teknologian yksikön (IBT) heinä-syyskuun välisenä aikana vuonna 2011. Työ tehtiin kahden tutkimusryhmän, proteiinidynamiikan ja molekyylibioteknologian, yhteisprojektina. Työn tavoitteena oli tutkia uusien avidiinimutanttien pistemutaatioiden vaikutusta proteiiniin ja sen ominaisuuksiin. Työ tehtiin professori Markku Kulomaan ja filosofian tohtori Vesa Hytösen alaisuudessa. Opinnäytetyöprosessia ohjasivat filosofian tohtori Juha Määttä ja filosofian maisteri Soili Hiltunen.

2 AVIDIINI JA BIOTIINI

2.1 Avidiini

Avidiini (Avd) on alun perin kananmunan valkuaisesta eristetty emäksinen homotetrameerinen glykoproteiini, jonka isoelektrinen piste on pH 10,5:ssä (Eakin, Snell & Williams 1940, 801 ja Woolley & Longworth 1942, 290). Avidiini koostuu neljästä yhtenevästä alayksiköstä, monomeerista, pituudeltaan 128 aminohappoa. Monomeerit sitovat kukin yhden biotiinimolekyylin. (DeLange & Huang 1971, 707 ja Livnah, Bayer, Wilchek & Sussman 1993, 5078.) Kanan avidiinissa on lisäksi hiilihydraattiketju kiinnittyneenä valmiiseen molekyyliin. Molekyylipainoltaan avidiinitetrameeri on 67 kilodaltonia (kDa). Ilman hiilihydraattiketjua molekyylipaino on 62,4 kDa ja kukin monomeeri yksinään 15,6 kDa. (DeLange & Huang 1971, 707.)

Raa'asta kananmunanvalkuaisesta eristetyn proteiinin havaittiin vaikuttavan biotiinin saatavuuteen hiivasolukasvatuksessa (Eakin ym. 1940, 801 ja Woolley & Longworth 1942, 290). Kananmunan valkuaisessa avidiinia on noin 0,05% valkuaisen proteiinimassasta (Green 1975, 85). Avidiinille on lisäksi löydetty seitsemän sukulaisgeeniä kanasta. Sukulaisgeenien määrä vaihtelee lintulajien välillä, mutta yhteisesti geenien tuottamia proteiineja kutsutaan avidiinin kaltaiseksi proteiineiksi. (Keinänen ym. 1994, 616–617.)

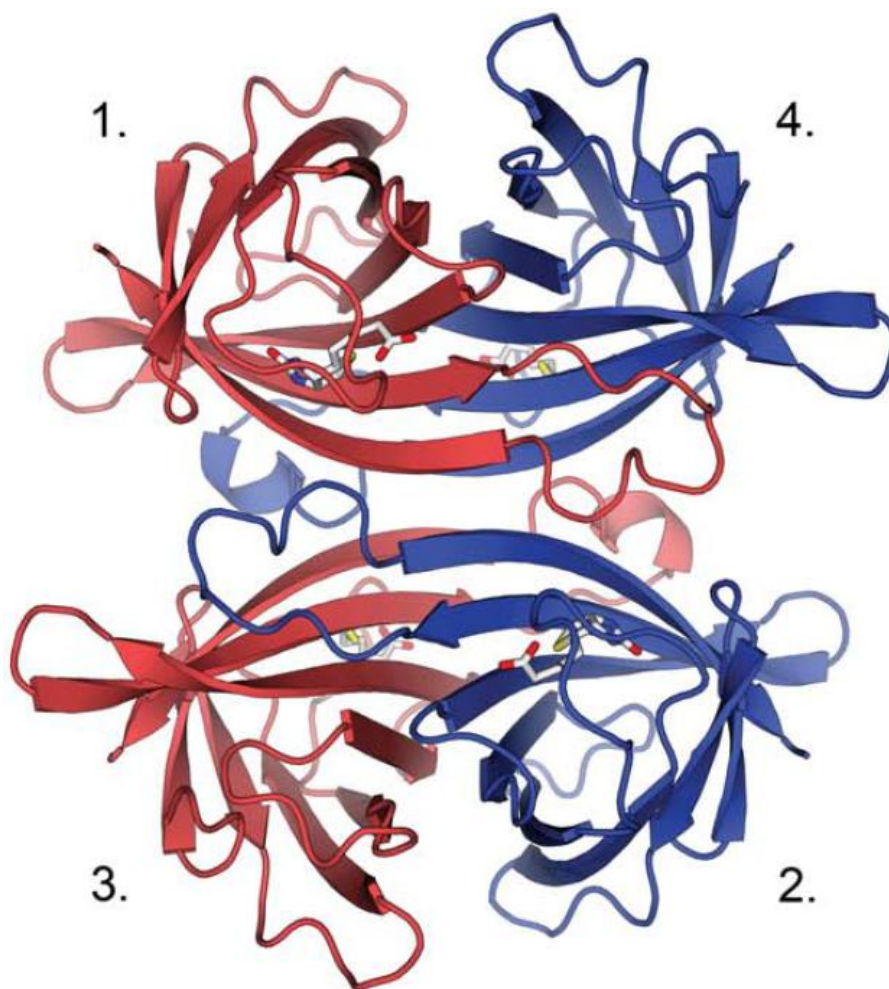
Myöhemmin on löydetty useita rakenteellisesti ja ominaisuuksiltaan kanan avidiinin kaltaisia proteiineja, niin bakteereista, sienistä, linnuista, kuin matelijoistakin (Hertz & Sebrell 1942, 257; Elo 1980, 221 ja Nordlund, Hytönen, Laitinen & Kulomaa 2005, 13250). *Streptomyces*-lajin bakteerien on havaittu tuottavan avidiinia, jossa ei ole lainkaan hiilihydraattiketjua. Streptavidiiniksi nimetyn bakteeriperäisen avidiinin ja kanasta (*Gallus gallus*) eristetyn avidiinin rakennetta, ominaisuuksia ja biotiininsitomiskykyä on tutkittu runsaasti viime

vuosikymmenten aikana. (Chaiet, Miller, Tausig & Wolf 1963, 28; Green 1975, 87 ja Laitinen ym. 2006.)

Avidiini tunnetaan erittäin tiukasta sitoutumisesta biotiiniin (Woolley & Longworth 1942, 290; Green 1963a, 588 ja Eakin ym. 1940, 801). Avidiinin on todettu olevan rakenteeltaan huomattavan kestävä niin radikaaleja pH-olosuhteita, detergenttejä, proteolyyttisiä entsyymejä kuin äärimmäisiä lämpötilojakin vastaan (Fraenkel-Conrat, Snell & Ducay 1952, 97; Green 1963c, 611–612; Ross, Carson & Fink 1986, 352–353 ja Green 1975, 91). Lisäksi avidiini-biotiini-kompleksin muodostuessa havaitaan stabiloitumista vielä entisestään (Fraenkel-Conrat ym. 1952, 97 ja Wei & Wright 1964, 341). Avidiinin kyky sitoa tiukasti biotiinia ja sen erityisen hyvä kestävyys tekevät proteiinista mielenkiintoisen tutkimuskohteen. Avidiini-biotiini-teknologian mahdollisuudet biotekniikan sovelluksiin ovat erittäin laajat.

2.2 Avidiinin rakenne

Avidiini on rakenteeltaan homotetrameerinen proteiini, jossa neljä yhteneväistä monomeeriä liittyvät toisiinsa muodostaen aktiivisen proteiiniyksikön. Monomeerit koostuvat kahdeksasta antiparalleelistä β -juosteesta, jotka muodostavat klassisen β -tynnyrimuodostelman (kuva 1, s. 8). Juosteet liittyvät toisiinsa kuudella silmukkarakenteella (kuva 9, s. 46). (Livnah ym. 1993, 5077 ja Pugliese, Coda, Malcovati & Bolognesi 1993, 703.) Silmukkarakenteet nimetään β -juosteiden välisiksi, niin että niiden nimessä näkyy, mitkä juosteet yhdistyvät silmukoiden kautta toisiinsa.



KUVA 1. Avidiinin tetrameerinen rakenne, johon avidiinin monomeerit on nimetty artikkelin Livnah ym. 1993 mukaan. Kukaan monomeeri koostuu kahdeksasta β -juosteesta, joita yhdistää kuusi silmukkarakennetta. Kuva artikkelista Leppiniemi ym. 2011.

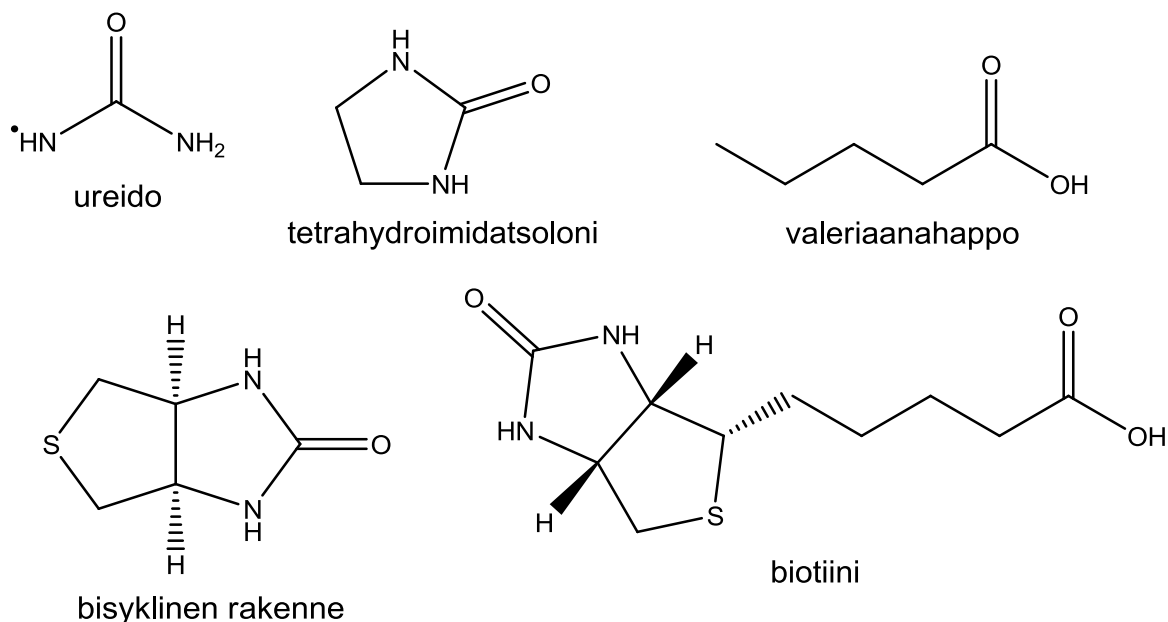
Kanan avidiinin aktiivisen tetrameerin muodostavista alayksiköistä kukin on käytännössä samanlainen koostuen 128 aminohaposta, missä asparagiini (N) 17:ään on sitoutunut hiilihydraattiryhmä (DeLange & Huang 1971, 707). Hiilihydraattisivuryhmä koostuu neljästä glukosamiinista ja viidestä mannoosista (Bruch & White 1982, 5334). Kukaan aminohappoketju sisältää N-terminaalisessa päässään alaniinin (A) ja C-terminaalisessa päässään glutamiinihapon (E). Lisäksi ketjussa on disulfidisidos kysteiinin (C) 4 ja C83 rikkiatomien välillä. Aminohapposekvenssissä on heterogeeninen alue, jossa näkyy vaihteleva aminohappo isoleusiini (I) tai treoniini (T) kohdassa 34. (DeLange & Huang 1971, 698, 707.)

Disulfididisidoksen (C4-C83) lisäksi kunkin monomeerin sisältä löytyy kolme suolasiltaa. Suolasillat muodostuvat positiivisesti ja negatiivisesti varautuneiden aminohappojen välille proteiinin kvaternäärisessä konformaatioissa. Ensimmäinen suolasilta yhdistää juosteen 7 E91:n ja juosteen 8 arginiini (R) 122:een. Toinen suolasilta ulottuu juosteen 7 R100:sta silmukan 7-8 asparagiinihappo (D) 109:ään. Kolmas suolasilta löytyy samalta alueelta D108:n ja lysiini (K) 111:n väliltä. Monomeerien sisäiset vetysidokset tasapainottavat monomeerin rakennetta entisestään. Monomeerien väliltä löytyy neljä suolasiltaa (2 dimeeriä kohden), missä monomeerin E28 liittyy suolasillalla toisen monomeerin histidiini (H) 50:een. Monimuotoinen vetysidosverkko yhdistää monomeereja. (DeLange & Huang 1971, 707 ja Pugliese ym. 1993, 703–705.)

Avidiinissa on kolme monomeeri-monomeeri-vuorovaikutusaluetta, jotka osaltaan vaikuttavat kvaternäärirakenteen jäykkyyteen ja mahdollistavat biotiinin tiukan sitoutumisen. Monomeerit 1 ja 2 sekä 3 ja 4 (kuva 1, s. 8) muodostavat toiminnalliset dimeerit, joissa kukin monomeeri luovuttaa tryptofaani (W) 110:n parilleen tärkeänä osana biotiinin sitomistaskua. Rakenteelliset dimeerit muodostuvat monomeerien 1–4 ja 2–3 välille, joista 1–4 interaktio vaikuttaa tetrameeriseen rakenteeseen eniten ja sitä onkin kutsuttu avidiinin tetrameeriseksi liimaksi. Suurin osa kontakteista on van der Waalsin sidoksia, mutta mukana on myös vahvoja vetysidoksia. (Livnah ym. 1993, 5078.) Kooltaan pieni, vain kolme aminohappoa käsittävä, dimeeri-dimeeri-pinta (1 ja 3, 2 ja 4) on tärkeä monomeereista muodostuvan oligomeerin stabiiliudelle (Laitinen, Hytönen, Nordlund & Kulomaa 2006, 2995).

2.3 Biotiini

Biotiini (Btn) on pieni, väritön ja vesiliukoinen B₇-vitamiini. Molekyyli on massaltaan 244,31 g/mol ja sen molemmissa päissä on poolinen atomi (kuvio 1). Biotiinin todettiin olevan tärkeä kasvutekijä hiivalle jo vuonna 1901 (Wildiers, 244–245). Vasta 40 vuotta myöhemmin, vuonna 1940, György, Melville, Burk ja du Vigneaud (245) selvittivät biotiinin olevan sama molekyyli kuin H-vitamiini ja koentsyymi R. Biotiinimolekyyliässä (heksahydro-2-oksi-1H-tieno[3,4-d]imidatsoli-4-pentaani-happo) on bisyklinen rengasrakenne, jossa yhdessä renkaassa on ureidoryhmä (tetrahydro-imidatsoloni) ja toisessa heterosyklinen rikkiatomi ja valeriaanahapposivuryhmä (kuvio 1). Biotiinia pystyvät syntetisoimaan ainoastaan bakteerit, homeet, hiivat, levät ja muutamat kasvilajit. (du Vigneaud, Hoffman & Melville 1942, 188 ja Vitamin Basics, 86.) D-biotiinin, eli biotiinin aktiivisen muodon kiinnittyminen, biotinylointi, säätelee monien solun aineenvaihdunnan entsyymien toimintaa ja se on avainroolissa lipidien, proteiinien ja hiilihydraattien aineenvaihdunnassa (Green 1975, 125 ja Vitamin Basics, 86).



KUVIO 1. Biotiinin rakennekaava ja molekyylin sivuryhmien määrittely

2.4 Avidiini-biotiini-kompleksi

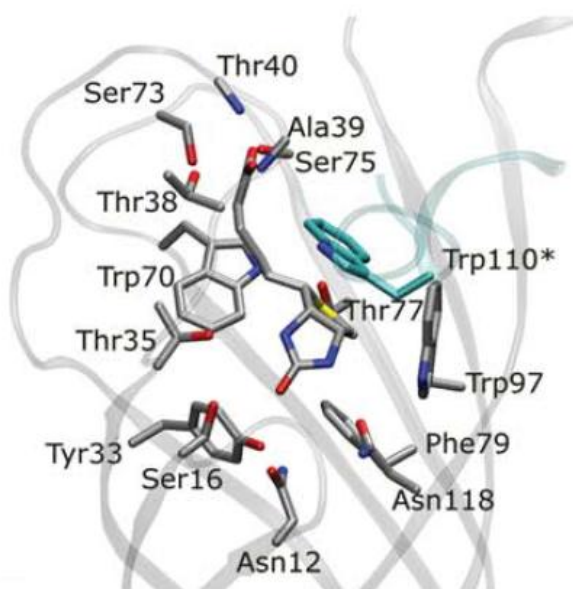
2.4.1 Biotiinin sitoutuminen avidiiniin

Biotiinin sitoutuminen avidiiniin on vahvin luonnosta tavattavista ei-kovalenttisista sitoutumisista. Dissosiaatiovakio (K_d) avidiini-biotiini-kompleksille on 10^{-15} M. (Green 1963a, 591.) Tetrameerin jokainen monomeeri kykenee sitomaan yhden biotiinimolekyylin (Livnah ym. 1993, 5078). Biotiinin sitoutumisaktiiviteetti pysyy lähes muuttumattomana esimerkiksi pH-olosuhteissa 2:n ja 13:n välillä. Kun biotiini on sitoutunut avidiiniin, kompleksin kestävyys kasvaa entisestään. Sitoutumisen jälkeen merkittävää ligandin vapautumista ei tapahdu. Äärimmäisissä olosuhteissa on mahdollista saada biotiinimolekyyli irtoamaan avidiinista. (Green 1963c, 618; Ross ym. 1986, 352 ja Wei & Wright 1964, 341.)

Päärynän muotoinen biotiinin sitomistasku sijaitsee molekyylin β -tynnyrin toisessa päässä, jossa on runsaasti sitomisen mahdollistavia aromaattisia ja poolisia aminohappotähteitä täydellisesti järjestäytyneinä vastaanottamaan biotiinimolekyylin. Biotiinin sitoutuminen korvaa sitoutumispaikassa muotoa ylläpitävät viisi vesimolekyyliä. Sitoutumisen tapahtuessa proteiinin konformaatio muuttuu yhden silmukoista (3–4, kuva 9, s. 46) taipuessa ja sulkiessa biotiinimolekyylin paikalleen. Tapahtuva konformaatiomuutos suojaa useita aikaisemmin esillä olevia aminohappotähteitä ympäristöltään, mikä osaksi selittää kompleksin lisääntyntä stabiiliutta verrattaessa tyhjään avidiiniin. (Livnah ym. 1993, 5078–5080; Pugliese ym. 707 ja Rosano, Arosio & Bolognesi 1999, 8.)

2.4.2 Biotiinin tunnistaminen ja tärkeät tähteet

Sitomistaskun perällä on rypäs useita vetysidoksen luovuttavia tai vastaanottavia aminohappotähteitä (N12, S16, Y33, T35 ja N118). Aminohappotähteet tunnistavat biotiinimolekyylin poolisen ureidorenkaan (kuvio 1, s. 10). Keskiosastaan sitomistasku on kuin pitkulainen kanava, täynnä poolittomia tähteitä (L14, W70, F79, L99 W97 ja toisen alayksikön W110). Sitomistaskua reunustavat joukko vetysidoksen mahdollistavia tähteitä (T38, S73, S75) (kuva 2). (Livnah ym. 1993, 5078–5080; Pugliese ym. 707 ja Rosano ym. 1999, 8.)



KUVA 2. Villityypin aidiinin biotiinin sitomiseen osallistuvat aminohappotähteet kuvattuna tikkumallina. Happiatomit näkyvät punaisina, typpi- ja rikkiatomit sinisinä, hiiliatomit harmaana. Viereisen monomeerin W110 näkyy korostettuna syaaninvärisenä. (Leppiniemi ym. 2011, 2.)

Lysiini-aminohappo (K111) osallistuu biotiinin sitomiseen vetysidoksella, vaikka se sijaitseekin sitomispaikan suuaukolla (Gitlin, Bayer & Wilchek 1987, 925; Pugliese ym. 1993, 707 ja Rosano ym. 1999, 8.). Tyrosiinitähteiden (Y33) muokkaaminen tetrameerisestä aidiinista aiheuttaa biotiinin sitomiskyvyn häviämisen, mikä osoittaa tähteiden keskeisen roolin sitomisessa (Gitlin, Bayer & Wilchek 1990, 528). Biotiinin sitomiseen osallistuvien tärkeiden tryptofaani-

tähteiden (70, 97, 110) muokkaaminen vaikuttaa huomattavasti molekyylin kykyyn sitoa biotiinia. Jo yhden tryptofaanitähteen muokkaaminen inaktivoi proteiinin (Gitlin, Bayer & Wilchek 1988, 282 ja Green 1963b, 605). Tryptofaani-tähteet muodostavat hydrofobisen taskun, joka mahdollistaa biotiinin sitoutumisen (Livnah ym. 1993, 5079; Pugliese ym. 1993, 707 ja Rosano ym. 1999, 9).

Biotiinin sitoutumiseen riittävät kanan avidiinilla ja streptavidiinilla vain tietyt biotiinin rakenneosat. Kanan avidiinille biotiinimolekyylistä tulee olla yhtenäinen ureidorengas, kun streptavidiinilla sitoutumisen varmistamiseksi riittää ehjä kaksoisrengasrakenne (kuvio 1, s. 10). (Gitlin ym. 1988, 282.) Näiden tietojen avulla voitaneen suunnitella proteiineille uusia ligandeja. Kanan avidiinissa oleva oligosakkaridisivuketju ei osallistu biotiinin sitomiseen, minkä osoittaa streptavidiinin kyky sitoa biotiinia (Hiller, Gershoni, Bayer & Wilchek 1987, 170–171). Bakteereilla ei useimmiten ole post-translationalista proteiininmuokkauskykyä, joten hiilihydraattiketjua ei aina liitetä valmiiseen proteiiniin (Benz & Schmidt 2002, 267).

Niin avidiini (Avd) kuin streptavidiinikin (sAvd) sitovat biotiinia suurella affiniteetilla, mutta niiden affiniteetissa on huomattava ero ($K_d(\text{Avd})=6 \times 10^{-16}$ M ja $K_d(\text{sAvd})=4 \times 10^{-14}$ M) (Livnah ym. 1993, 5080). Avidiinin korkeampaa affiniteettia biotiiniin saattavat selittää muutamat eroavaisuudet sitomispaikassa. Ensinnäkin streptavidiinin W92 reagoi avidiinin F79:n paikalla ja toiseksi avidiinilla on yksi ylimääräinen aromaattinen tahde, F72. F72:n johdosta avidiinin sitoutumistaskussa on viisi aromaattista aminohappotähdettä, kun streptavidiinilla on vain neljä. F72 reagoi biotiinin valeriaanahapporyhmän kanssa. Myös karboksiterminuksessa vetysidosten määrä eroaa avidiinin ja streptavidiinin välillä. Avidiini pystyy tekemään viisi vetysidosta kun streptavidiini vain kaksi. Streptavidiinin kaikki neljä tryptofaanitähdettä osallistuvat biotiinin sitomiseen. Lisäksi avidiinin vahvempaa sitoutumista biotiiniin saattaa selittää pidemmät sitoutumiseen osallistuvat silmukkarakenteet. (Livnah ym. 1993, 5078–5080 ja Pugliese ym. 707.)

2.4.3 Avidiini-biotiini-teknologia ja pienligandien sitominen

Avidiinin muokkaamista uusien pienligandien sitojaksi tukee avidiinin helppo muokattavuus, sillä proteiinia koodaa vain yksi geeni (Wallen, Laukkanen & Kulomaa 1995, 205). Proteiinin erityinen stabiilius luo pohjaa lukuisille sovellusmahdollisuuksille, joita lisää sen hyvä liukoisuus niin vesi- kuin suolaliuoksissakin. Luonnollinen korkea affiniteetti kohti avidiinin ligandia, biotiinia, mahdollistaa jo avidiini-biotiini-sitoutumiseen perustuvia teknologioita. Laitinen ym. (2006) kertoo artikkelissaan avidiinin sitomisaffiniteetin aikaisemmista onnistuneista muokkauksista. Tämän lisäksi Hytönen ym. (2004) ovat todistaneet avidiinin biologisesti aktiivisen muodon tehokkaan ja edullisen tuottamisen *E. coli* -bakteerisoluisissa.

Avidiinin silmukkarakenteita on muokattu vaikuttamatta proteiinin kolmiulotteiseen rakenteeseen merkittävästi, esimerkiksi Riihimäki ym. (2011) ovat muokanneet avidiinin sitomaan steroideja. Silmukkarakenteiden 1–2, 3–4 ja 5–6 tiedetään osallistuvan biotiinin sitomiseen ja niitä muokkaamalla voitaneen kehittää enemmän uusia ligandeja sitovia avidiineja (Livnah ym. 1993, 5078–5080, kuva 9, s.46). Tähän työhön käytetyt avidiinimutantit saatiin aikaan käyttämällä kohdennettua satunnaismutageneesiä ja seulomalla mutantteja haluttua molekyyliä vastaan (Riihimäki ym. 2011, 1 ja Hiltunen ym. käsikirjoitus valmisteilla).

Villityypin avidiinin rakenne ja toiminta on laajalti tunnettua, joten sitä on helppo käyttää runkona suunniteltaessa uusia sitomisominaisuuksia. Hytönen ym. (2005b) ja Leppiniemi ym. (2011) ovat esimerkiksi muokanneet avidiinista kahta eri ligandia sitovaa ”Dual Chain” -avidiniä, jossa villityypin avidiinin rakenteeseen on yhdistetty muokattuja avidiineja. Avidiinin stabiliteettia on myös muokattu runsaasti: erittäin stabiili avidiini on esimerkiksi Hytönen ym. (2005a) ja Määttä ym. (2011) artikkelissa kuvattu kimeerinen avidiini, ChiAvd(I117Y).

Tällä hetkellä avidiinia käytetään jo useissa biokemiallisissa sovelluksissa. Avidiini-biotiini-teknologia on osoittautunut vaihtoehdoksi affiniteettikromatografiassa biotinyloitujen tuotteiden puhdistukseen (Bayer & Wilchek 1990, 3). Diagnostiikassa samaan tapaan on mahdollista konjugoida vasta-aineita biotiiniin ja tunnistaa ne (strept)avidiniilla (Switzer & Garrity 1999, 295). Terapeuttisista sovellutuksista avidiini-biotiini-teknologiaa on käytetty muun muassa lääkekohdennukseen (Lesch, Kaikkonen, Pikkarainen & Ylä-Herttuala 2010, 551). Mahdollisuudet uusiin avidiiniperäisiin teknologioihin kasvavat muokkaamalla avidiinia sitomaan uusia ligandeja. Avidiinia on mahdollista käyttää vasta-aineiden tavoin hyödyntämällä sen ligandispesifisyyttä. Vasta-aineista poiketen avidiini kestää radikaalejakin olosuhteita. (Riihimäki ym. 2011, 1 ja Green 1975, 91.)

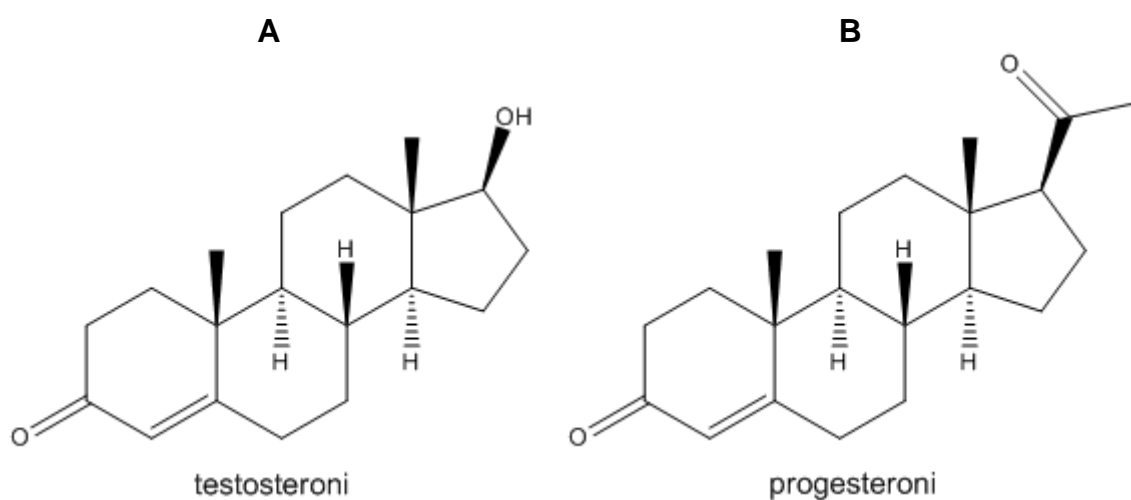
2.5 Testosteroni ja progesteroni

Steroidit ovat hydrofobisia molekyylejä, joita esiintyy biologisten kalvojen rakenteissa eukaryoottisoluissa. Steroidit koostuvat neljästä toisiinsa kiinnittyneestä rengasrakenteesta. Renkaista kolme koostuu kuudesta hiiliatomista ja yksi viidestä. Steroidit ovat biologisesti tärkeitä ja ne toimivat esimerkiksi solujen välisinä viestimolekyyleinä ja säätelevät solujen aineenvaihduntaa. Kolesterolin on steroideista tärkein, sillä se toimii muiden steroidimolekyylien, kuten esimerkiksi sukupuolihormonien esiasteena. (Campbell & Farrell 2008, 206–208, 716, 725.)

Vuonna 1935 David, Dingemans, Freud ja Laqueur (281–238) eristivät ja tunnistivat kiveksissä erittyvän steroidihormonin, jonka he nimesivät testosteroniksi (Tes). Butenand ja Hanisch (1935a, 89) selvittivät molekyylin rakenteen (kuvio 2, A, s. 16) olevan kiinteä polysyklinen alkoholi, jossa hydroksyyli-ryhmä on hiiliatomissa 17 (17 β -hydroksiandroster-4-en-3-oni). Molekyyllissä on kaksi poolista happiatomia. Jo samana vuonna Butenand ja Hanisch (1935b, 1859)

sekä Ruzicka ja Wettstein (1935, 1264) raportoivat hormonin synteettisestä tuottamisesta kolesterolista.

Progesteroni (Pro) on sukupuolihormoni, joka tunnistettiin keltarauhasesta itsenäisesti neljässä eri tutkimusryhmässä (Allen 1935, 89–93; Butenand & Westpahl 1934, 1440–1442; Hartmann & Wettstein 1934, 878–882 ja Slotta, Ruschig & Fells 1934, 1270–1273). Steroidihormoneihin kuuluva progesteroni (pregn-4-eeni-3,20-dioni) sisältää ketoniryhmän (kuvio 2, B) ja kaksi poolista happiatomia molekyylin päissä. Progesteroni toimii prekursorina toisille sukupuolihormoneille, esimerkiksi testosteronille (Campbell & Farrell 2008, 636).



KUVIO 2. Testosteronin (A) ja progesteronin (B) rakennekaavat

3 REKOMBINANTTIPROTEIINIEN TUOTTO, PUHDISTUS JA KARAKTERISOINTI

3.1 *Escherichia coli* tuotto-organismina

3.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) on gram-negatiivinen bakteeri, joka voi elää niin aerobisissa kuin anaerobisissakin olosuhteissa. Bakterisolut ovat muodoltaan sauvamaisia, keskimäärin läpimitaltaan 1,1–1,5 µm ja pituudeltaan 2,0–6,0 µm. (Willey, Sherwood & Woolverton 2009, 36, 49.) Bakterien liikkeen mahdollistavat flagellat (Darnton, Turner, Rojevsky & Berg 2007, 1757). *E. coli* voi käyttää energiantuotantoonsa lukuisia substraatteja. Anaerobisesti kasvaessaan energia tuotetaan fermentaation kautta. (Willey, Sherwood & Woolverton 2009, 204 ja Encyclopaedia Britannica 2011.) Bakteeri kasvaa parhaiten +37 °C lämpötilassa, mutta jotkin laboratorioskannat voivat lisääntyä korkeammissakin lämpötiloissa (Fotadar, Zaveloff & Terracio 2005, 403).

E. coli -bakteeria on tutkittu runsaasti laboratorio-olosuhteissa. Bakteerin kasvattaminen on helppoa ja halpaa, sitä voidaan manipuloida ja sen toiminta tunnetaan erityisen hyvin. *E. coli* on noussut eniten käytetyksi prokaryoottiseksi työkaluksi modernissa bioteknologiassa ja teollisessa mikrobiologiassa. Nykyään vieraan materiaalin tuottaminen *E. coli* -soluissa on bioteknologian kivijalka. (Baneyx 1999, 411 ja Willey, Sherwood & Woolverton 2009, 353, 365.)

Bakteereilla on kyky ottaa sisään solun ulkopuolista materiaalia. Siirtämällä bakteerin sisään vieras plasmidi voidaan bakteerissa ekspressoida useita eri proteiineja. (Campbell & Farrell 2008, 365.) Proteiinien tuottoon bakteerissa on

muutamia rajoituksia. Post-translationalisen muokkauskyvyn puuttuminen useissa bakteerisoluiissa estää monimutkaisten proteiinien tuoton. Myöskään suurempien tai useita disulfidisidoksia sisältävien proteiinien tuotto ei välttämättä onnistu bakteereissa. (Campbell & Farrell 2008, 376.)

3.1.2 Avidiinin tuottaminen *E. coli* -soluissa

Natiivilla kanan avidiinilla on yksi post-translationalinen muokkaus: asparagiinivälitteinen glykosylaatio asemassa 17. Proteiinin sisältämä hiilihydraattiryhmä on osasyynä epäspesifiseen sitoutumiseen, mikä estää avidiinin käytön tietyissä menetelmissä. Hiilihydraattiketju käsitellään eri tavalla luonnollisissa avidiineissa, mikä edelleen tekee natiivi-avidiinien valmistuksesta heterogeenisempää. Tästä syystä glykosylaation puutos *E. coli*:ssa on etu, sillä hiilihydraattiketjun tiedetään olevan avidiinille biotiinin sitomisaktiiviteetin kannalta merkityksetön. (Hiller ym.1987, 170–171 ja Hytönen ym. 2004, 389.)

Proteiinin tuottaminen bakteerin solukalvojen väliseen, eli periplasmiseen tilaan tarjoaa proteiinien, kuten avidiinin, tuottamiseen muutamia huomattavia etuja. Disulfidisiltojen muodostuminen ja ympäristöstä puuttuva biotiini mahdollistaa täyden aktiiviteetin avidiinin tuottamisen. Kuitenkaan avidiinin natiivi erityysignaali ei tehokkaasti tunnistu *E. coli*:ssa, joten sen katkaisu valmiissa proteiinissa on puutteellista. Käyttämällä *Bordetella avium* -bakteerista peräisin olevaa bakteerien omaa OmpA-erityssignaalia tulee erityysignaali katkaistua täydellisesti lopullisesta tuotteesta. (Baneyx 1999, 417–418 ja Hytönen ym. 2004, 388.) Tyypillinen puhdistetun proteiinin määrä on noin 10 mg/l, kun käytetään OmpA-signaali-peptidiä ja puhdistus tehdään 2-iminobiotiinagaroosilla (Hytönen ym. 2004, 388). OmpA-signaalin avulla bakteerissa tuotettua avidiinia kutsutaan tässä työssä villityypin avidiiniksi (wtAvd).

3.2 Tuoton vaiheet

3.2.1 Vektori ja insertti

Vektori on pala DNA:ta, jonka avulla voidaan siirtää solun ulkopuolista materiaalia isäntäsoluun. Vektori replikoituu itsenäisesti erillään kromosomaalisesta DNA:sta, mistä syystä sitä voidaan käyttää rekombinantti-DNA:n ilmentämiseen. Rekombinantti-DNA:ksi kutsutaan kahdesta eri lähteestä yhdistettyjä DNA-fragmentteja. Esimerkiksi vektori ja siihen liitetty vieras DNA-fragmentti on rekombinantti-DNA:ta. (Farrell & Ranallo 2000, 277–279.) Vieras DNA-fragmentti on tutkimuksen kohteena oleva lyhyt DNA-sekvenssi, joka usein koodaa tiettyä polypeptidiä. DNA-fragmenttia voidaan kloonauksen yhteydessä kutsua myös insertiksi. (Farrell & Ranallo 2000, 280.) Kun vieras DNA on yhdistetty vektoriin, voidaan se kuljettaa isäntäsoluun. Vektori monistuu isäntäsolun sisällä tuottaen klooneja, jotka voidaan eristää ja analysoida. Yleisimmin käytettäviä vektoreita ovat plasmidit, kosmidit ja bakteriofaagit. (Farrell & Ranallo 2000, 277–279 ja Switzer & Garrity 1999, 314.)

Plasmidit ovat itsenäisesti replikoituvia sirkulaarisia DNA-palasia, joita esiintyy esimerkiksi bakteerisoluissa. Itsenäisen replikoitumisen varmistumiseksi vektoreiksi soveltuvissa plasmidissa tulee olla replikaation aloituskohta (origin of replication, oriC) ja selektiivisyyden mahdollistava markkeri, esimerkiksi antibioottiresistenssin aiheuttava geeni, jotta halutut solut on mahdollista erottaa muista. Plasmidilla tulee myös olla useita restriktiokohtia, joiden avulla ulkopuolinen DNA siihen liitetään. Kaupallisissa vektoreissa restriktio-entsyymien katkaisukohdat ovat konsentroituneena tietylle alueelle plasmidissa, jota kutsutaan polylinkkerialueeksi (multiple cloning site, MCS). Plasmideita onkin muokattu runsaasti niiden kloonaukseen varten. (Farrell & Ranallo 2000, 279 ja Switzer & Garrity 1999, 315.) Erityisesti proteiinin tuoton jälkeistä puhdistusta helpottaa vektoreihin usein liitetty puhdistuskahva, kuten kuusi kertaa toistuva histidiinitähde (6xHis) (Campbell & Farrell 2008, 383).

Työssä käytetyn pET101/D-TOPO[®]-vektorin (Invitrogen) kartta on esitetty liitteessä 1. Vektori (5753bp) kantaa valmiina resistenssiä ampisilliinille (amp^r), sekä puhdistukseen tarvittavaa histidiinipuhdistuskahvaa (6xHis). Insertti (~600bp) on kloonattu TOPO-kloonauksen avulla vektoriin. Geenin tuottumista säätelee vahva T7-promoottori, jota hallinnoi *lac*-operaattori (*lacO*). T7-promoottori käynnistyy *lacO*:n toimesta kun sen saatavilla on laktoosia. T7-promoottorin tunnistaa ainoastaan T7-polymeraasi. T7-polymeraasin tuotantoa hallitaan käytettävien solujen arabinoosioperonin kautta, eli käytössä on kaksinkertainen repressio. Työssä käytetään T7-promoottorin indusoimiseen isopropyyli β -D-tiogalaktosidaasia (IPTG), joka on laktoosin analogi, ja L-arabinoosia arabinoosioperonin käynnistämiseen. Indusoinnilla tarkoitetaan geenin toiminnan käynnistämistä. (Invitrogen 2010a, 2, 11.)

3.2.2 Transformaatio kompetentteihin soluihin ja selektio

Transformaatiolla tarkoitetaan prosessia, jossa ulkopuolinen DNA muuttaa prokaryoottisen isäntäsolun toimintaa, eukaryoottiselle solulle käytetään termiä transfektio. Bakteerit ottavat luonnostaan materiaalia sisäänsä ympäristöstä, joten kyseistä prosessia voidaan optimoida ulkopuolisen DNA:n sisäänoton suosimiseksi. Tämä tarkoittaa bakteerin tekemistä kompetentiksi. Kompetentin bakteerin solukalvo on entistä herkempi materiaalin sisäänottoon tietyissä olosuhteissa. Solukalvon läpäisevyyden muutos voidaan saada aikaan esimerkiksi lämpötilaa nostamalla tai elektroporaatiolla. Transformaation avulla insertti saadaan sisään osaan bakteerisoluista käytettäessä kompetentteja soluja. Vaikka isäntäsolut altistuvatkin vaikeille olosuhteille, osa niistä kuitenkin toipuu ja pitää sisällään uutta plasmidia. (Farrell & Ranallo 2000, 286–287 ja Switzer & Garrity 1999, 326.)

Selektiolla tarkoitetaan prosessia, jossa oikein transformoidut solut, jotka sisältävät insertti-vektori-yhdistelmän valitaan. Selektiivisyysmarkkeri mahdollistaa valitsemisen, esimerkiksi vektorin sisältämän antibioottiresistenssigeenin

avulla bakteeri kasvaa antibiootin läsnäollessa. (Farrell & Ranallo 2000, 287 ja Switzer & Garrity 1999, 314–315.) Vain vektorin sisältävät bakteerisolut voivat kasvaa, kun ne maljataan antibioottia sisältävälle elatusaineelle. Selektiivisyyden ainoana vaatimuksena on, että vektorissa on jokin fenotyyppiä muuttava geeni, jota isäntäsolussa ei ole. (Switzer & Garrity 1999, 329.)

3.2.3 Tuotteen ekspressio

Vektoreilla on usein replikaation aloituskohta, joka soveltuu useammalle bakteerille. Monipuolinen replikaation aloituskohta mahdollistaa tuotteen ilmentämisen eri organismeissa. Replikaation aloituskohdan ominaisuudet määrittelevät solun sisällä olevan plasmidin monistustiheyden. Hitaasti monistuvan plasmidin replikaation aloituskohtaa säätelee solun oma jakautumissykli ja plasmideita monistuu soluun vain muutama. Nopeasti monistuvan plasmidin replikaation aloituskohta ei ole tiiviisti sitoutuneena solujakautumiseen, mistä johtuen nopeasti monistuvia plasmideita voi olla useita satoja yhdessä solussa. (Switzer & Garrity 1999, 314.) Useisiin vektoreihin on liitettyä vahva promootorialue MCS:n 5'-päähän. MCS:ään promoottorin jälkeen kloonattuja geenejä voidaan ekspressoida runsaasti. (Switzer & Garrity 1999, 315–316.)

Usein on tarpeellista säädellä jotenkin geenin ilmentymistä, ekspressiota, isäntäsolussa. Esimerkiksi tilanteissa kun geenin tuottama tuote on myrkyllinen soluille. Monet promoottorialueet ovatkin indusoitavissa. Indusoiminen mahdollistaa, että geenin ilmeneminen käynnistyy. Indusointi voidaan saada aikaan tietyn molekyylin läsnä ollessa tai tietyissä olosuhteissa. Indusoimalla voidaan määrittellä halutun geenin ilmentymisajankohta. (Farrell & Ranallo 2000, 288 ja Switzer & Garrity 1999, 316.)

3.2.4 Viljeltävät solut

Solulinjaksi kutsutaan tietynlaisia soluja, prokaryoottisia tai eukaryoottisia, joilla on tunnettu genotyyppi. Rekombinantti-DNA-teknologian kloonauksessa ja vieraiden proteiinien ilmentämisessä käytetään kahdenlaisia bakteerisolulinjoja, toisia vieraan DNA:n kloonaukseen ja toisia proteiinien ilmentämiseen. Jokainen solulinja on muokattu tiettyä tehtävää varten ja lisäksi joskus jopa tiettyä vektoria varten käytettäväksi. (Farrell & Ranallo 2000, 285.)

Työssä käytettävä BL21-AITM *E. coli* -solukanta (Invitrogen) on tarkoitettu ekspressio-isännäksi. Solun geenien ilmentymistä voidaan kontrolloida. Glukoosi repressoii T7:ää ja L-arabinoosi indusoi geenin ekspressiota. Säätelemahdollisuutensa vuoksi solukanta sopii erityisen hyvin toksisten proteiinien tuottoon. (Invitrogen 2010b, 1–3, 6 ja Farrell & Ranallo 2000, 289–290.) BL21-AITM *E. coli* -soluilla (Invitrogen) on myös tetrasykliiniresistenssi (tet_r) (Invitrogen 2010a, 1).

3.3 Tuotteen puhdistus

3.3.1 Homogenisointi

Solujen sisältöä ympäristöltä suojaa solumembraaneista koostuva rakennelma. Membraanit antavat solulle mekaanista kestävyyttä ja säilyttävät sen muotoa. Elastisten ominaisuuksiensa avulla solumembraani kestää ympäristössä tapahtuvia nopeita osmoottisen paineen muutoksia. Tutkittaessa solun sisäisiä biomolekyylejä tulee solu ensin hajottaa. Solun hajottamisprosessia kutsutaan soluhajotukseksi tai solulyysikseksi. (Campbell & Farrell 2008, 123 ja Cell Disruption & The French Press nd, 1.)

Solulyysiksen tarkoituksena on (1) saattaa mahdollisimman paljon tuotetta liukoiseksi säilyttäen sen biologinen aktiivisuus, (2) välttää tuotteen muokkausta inaktiiviseen muotoon (esimerkiksi denaturoimalla, hapettamalla tai proteolyyksillä) ja (3) rajoittaa hajotuksen haitat vain hajotukseen. Tavoitteiden saavuttamiseksi solulyysiksen tulee olla nopeaa ja tehokasta. Lisäksi käytettävän hajotustavan tulee olla tarpeeksi voimakas soluseinien hajottamiseen, mutta tarpeeksi hellävarainen säilyttämään solun sisäinen materiaali koskemattomana. (Cell Disruption & The French Press nd, 1–2 ja Yacko 2004.)

Soluhajotustekniikat voidaan jakaa kahteen pääluokkaan: mekaaninen ja ei-mekaaninen hajotus. Ei-mekaanisia hajotustapoja ovat muun muassa kemiallinen ja entsymaattinen hajotus, permeabiliteetti sekä osmoottinen shokki. Mekaanisia hajotustapoja ovat esimerkiksi homogenisointi, ultraääni-hajotus ja sentrifugointi. Hajotustavan valintaan vaikuttavat solujen tyyppi, kasvu ja säilytyshistoria. (Cell Disruption & The French Press nd, 1–2 ja Yacko 2004.)

Paineistetun homogenisaation etuna on näytteen käsittelyn helppous, mahdollisuus käsitellä suurta näytemäärää kerralla ja vähäinen lämmönkehitys. Esimerkiksi liuoksessa kasvatettujen solujen homogenisointi onnistuu usein suoraan syöttämällä liuos homogenisaattoriin. Painehomogenisointi onkin yleinen solujen hajotustapa. French press -homogenisaattorissa solut pakotetaan kulkemaan hyvin kapean kanavan tai aukon läpi paineen alaisena. Kulkiessaan laitteen läpi soluseinien ulkoinen paine laskee nopeasti kohti vallitsevaa painetta. Soluseinän rikkoutuminen tapahtuu suuren paineen laskun, leikkausvoimien ja kovien virtauksien aiheuttamien yhteisvaikutusten kautta. (Cell Disruption & The French Press nd, 3 ja Yacko 2004.)

3.3.2 Differentiaalisentrifugointi

Differentiaalisentrifugoinnin avulla pystytään erottamaan kokonaisesta solusta sen osia. Solut tulee ensin hajottaa homogenisoinnin avulla, minkä jälkeen homogenisoitu liuos sentrifugoidaan. Tutkittavaa materiaalia sentrifugoidaan asteittain yhä suuremmilla kierrosnopeuksilla ja pitenevällä ajalla kunnes haluttu materiaali pelletoituu, eli sedimentoituu sentrifugointiastian pohjalle ja muut partikkelit jäävät liukseen, eli supernatanttiin. Erottuminen perustuu partikkelien kokoon ja tiheyteen, suuremmat ja tiheimmät partikkelit sedimentoituvat ensin. Täysin puhtaita fraktioita menetelmällä ei kuitenkaan saada aikaan, mutta kuitenkin halutun komponentin osalta suuresti rikastuneita. Asteittain sentrifugoimalla on mahdollisuus erottaa eri soluelimiä toisistaan. Fraktioiden puhtautta voidaan parantaa suspensoimalla pelletit puskuriin ja sentrifugoimalla uudelleen. (Lodish ym. 2000, 85–86, 154–155 ja Campbell & Farrell 2009, 124–125.)

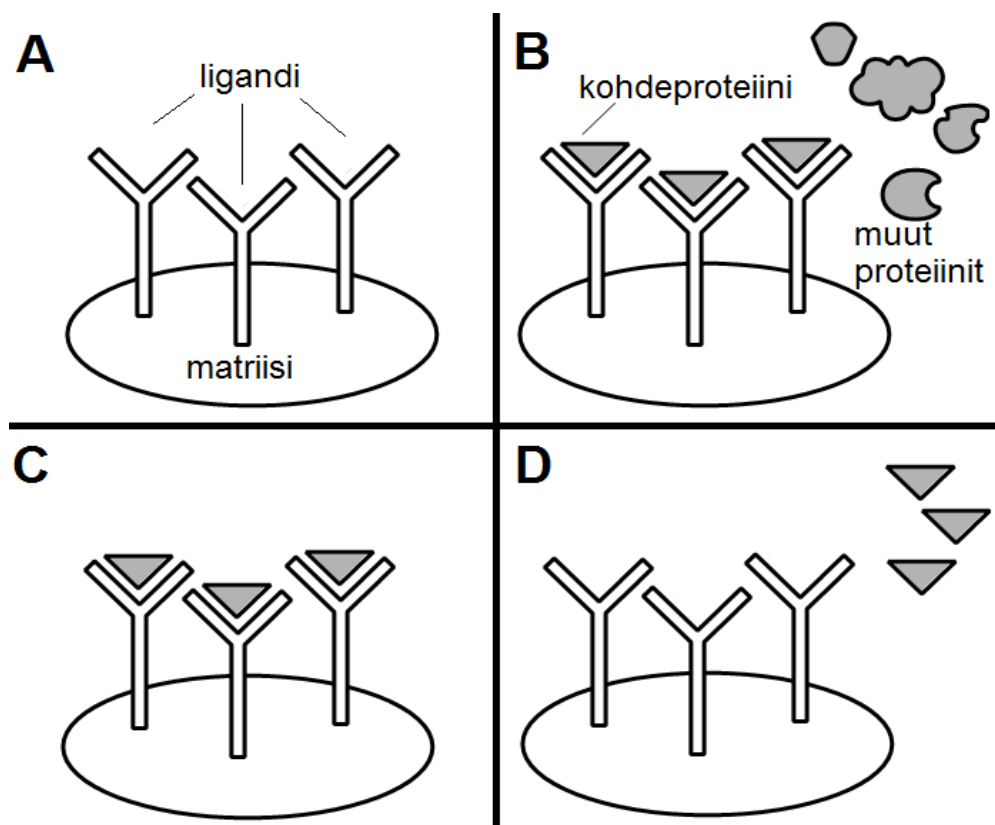
Sentrifugoinnin avulla pystytään myös konsentroimaan joitakin liuoksessa olevia partikkeleita. Ultrafiltraatioputkissa, joissa on sisällä puoliläpäisevä kalvo, voidaan suurten partikkelien konsentraatiota liuoksessa kasvattaa. Putkessa olevan membraanin läpäisevät tiettyä molekyylikokoa pienemmät partikkelit suurempien pidättyessä kalvolle. Suuri kalvopinta-ala ja pystysuuntainen operaatiotila mahdollistavat nopean näytteen käsittelyn ja korkean näytesaannon. Sentrifugoinnin jatkuessa yhä enemmän pieniä partikkeleita ajautuu kosketuksiin kalvon kanssa lopulta läpäisten sen. Kalvolle pidättyneessä liuoksessa suurempien partikkelien konsentraatio on huomattavasti korkeampi, jopa 80-kertainen aloitukseen verrattuna. (Millipore 2009.)

3.3.3 Affiniteettikromatografia

Affiniteettikromatografia perustuu reversiibeliin interaktioon erotettavan proteiinin ja sille spesifisen ligandin avulla. Ligandi on sitoutettuna kromatografiseen matriisiin, jonka lävitse liuosmuodossa oleva erotettava proteiini viedään. Affiniteettikromatografinen puhdistus on helposti toteutettavissa milloin tahansa, kun haluttua erotettavaa komponenttia ja sen ligandia on saatavilla. Menetelmä on hyvin selektiivinen ja tästä johtuen sen erotuskyky on korkea. Tuloksena saadaan kohdeproteiinia suuressa konsentraatiossa, jossa sen puhdistusta voidaan vielä jatkaa tai siirtyä eteenpäin. (Amersham Pharmacia Biotech 2001, 8–9; Farrell & Ranallo 2000, 143–144; Sheehan 1996, 269 ja Switzer & Garrity 1999, 34–35.)

Proteiinin ja ligandin väliset biologiset interaktiot syntyvät joko hydrofobista tai elektrostaattisista interaktioista, van der Waalsin voimista tai vetysidoksista. Prosessin tulee olla reversiibeli, jotta kohdeproteiini voidaan eluoida affiniteettimatriisista. Eluointi voi tapahtua spesifisesti, käyttämällä kompetetiivista ligandia, tai ei-spesifisesti muuttamalla liuoksen pH:ta, ionivahvuutta tai polariteettia. Affiniteettikromatografinen puhdistus vaatii biospesifisen ligandin, joka säilyttää aktiivisuutensa ollessaan kovalenttisesti sidottuna kromatografiseen matriisiin ja substraatin, joka voidaan eluoida. Steeristen haittojen välttämiseksi ligandi voidaan kiinnittää matriisiin väliaineen avulla. (Amersham Pharmacia Biotech 2001, 9–13 ja Farrell & Ranallo 2000, 144, 147.)

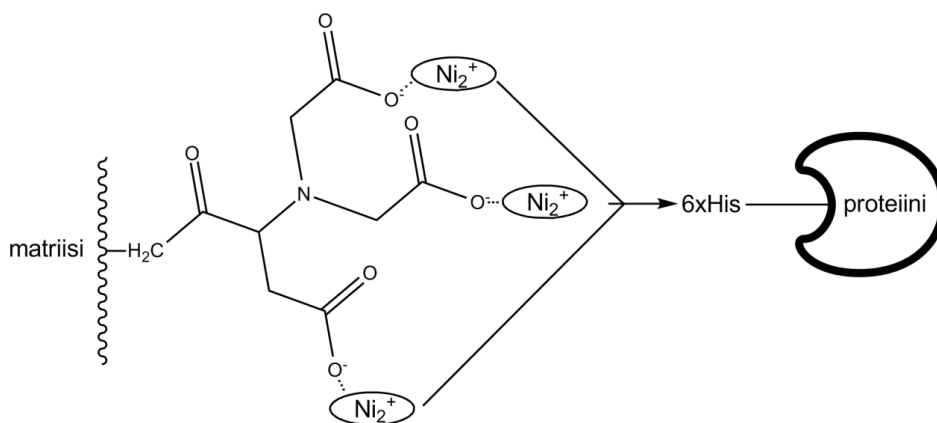
Käytännön affiniteettikromatografisessa puhdistuksessa on neljä vaihetta, jotka on kuvattu sivulla 26 kuvan 3. Ensin affiniteettimedia tasapainotetaan sitoutuspuskuriin, eli puskuriin, jossa haluttu proteiini on. Toiseksi affiniteettimedian lävitse ajetaan näyte, olosuhteissa, joissa sitoutuminen ligandiin tapahtuu spesifisesti. Sitoutumisen jälkeen matriisista huuhdellaan ensin sitoutumaton materiaali ulos, minkä jälkeen kohdeproteiini voidaan eluoida muuttamalla olosuhteet suosimaan sitoutuneen molekyylin irtoamista. Viimeiseksi affiniteettimedia tasapainotetaan takaisin sitoutuspuskuriin.



KUVA 3. Affiniteettikromatografisen puhdistuksen vaiheet. (A) Affiniteettimedian tasapainotus sitoutuspuskurilla. (B) Näytteen syöttö, spesifinen sitoutuminen ligandin ja kohdeproteiinin välillä, milloin ligandi tunnistaa ainoastaan kohdeproteiinin ja muut proteiinit eivät sitoudu. (C) Pylväs pestään sitoutuspuskurilla, jolloin muut proteiinit huuhtoutuvat ulos ja (D) kohdeproteiini eluoidaan affiniteettimediasta. Lopuksi affiniteettimedia tasapainotetaan sitoutuspuskurilla alkutilaansa (A).

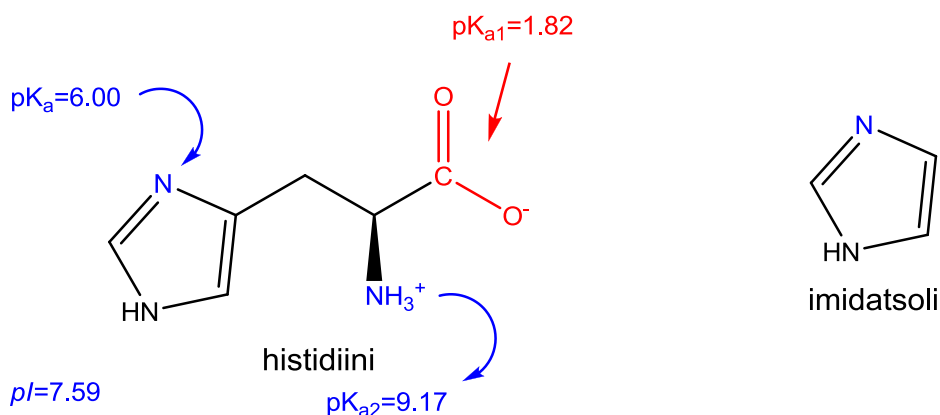
3.3.4 Immobilisoitu metalliaffiniteettikromatografia

Hartsiin metalli-ioneja kelatoivan reagenssin avulla kiinnitetyllä metallilla voidaan puhdistaa histidiiniä sisältäviä proteiineja. Menetelmää kutsutaan nimellä immobilisoitu metalliaffiniteettikromatografia (immobilized metal affinity chromatography, IMAC). Erityisen tehokas menetelmä on puhdistettaessa polyhistidiinipuhdistuskahvallis (6xHis) proteiineja (kuva 4, s. 27). Puhdistuskahva vähentää myös epäspesifistä sitoutumista, sillä se on yleensä vahviten metalli-ioniin sitoutuva komponentti. Yleisesti suositaan suoloja, jotka sisältävät kahdenarvoisen kationin (Zn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Cu^{2+}). (Switzer & Garritty 1999, 38.)



KUVA 4. Esimerkki histidiinipuhdistuskahvallisen proteiinin puhdistamisesta Ni^{2+} -metalli-iona sisältävällä IMAC-hartsilla (nitriloetikkahappo) (Switzer & Garrity 1999, 39, muokattu)

Histidiini on emäksinen aminohappo, jonka isoelektrinen piste (pI) on pH 7,59:ssä. Aminohapot esiintyvät pI:ssä neutraaleina kaksoisioneina. Happamissa olosuhteissa aminohappo on protonoitunut ja esiintyy pääosin kationina ja emäksisissä olosuhteissa pääosin deprotonoituna anionina. Histidiinillä on sivuketjunaan heterosyklinen imidatsolirengas, eikä histidiini ole tarpeeksi emäksinen protonoituakseen soluissa vallitsevissa pH-olosuhteissa (pH 7,3), mistä johtuen aminohappo esiintyy yleisesti anionina (kuvio 3). (McMurry & Simanek 2007, 479–482.)



KUVIO 3. Histidiinin ja imidatsolin rakennekaavat. Histidiinimolekyylissä on imidatsolirengasrakenne. Histidiini aminohappo on protonoitunut vasta pH 6,00:ssa.

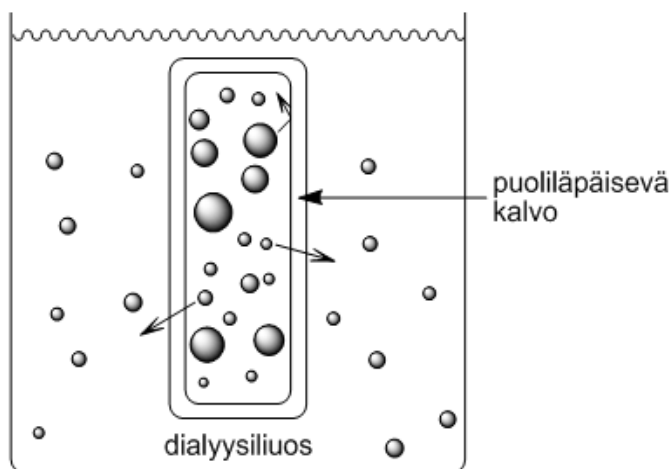
Proteiinit, jotka kiinnittyvät IMAC-kolonnein esillä olevan histidiinin avulla, voidaan eluoida kolmella eri tapaa. (1) Alentamalla liikkuvan faasin pH:ta, jolloin histidiini varautuu positiivisesti, eikä enää sitoudu metalli-ioniin. (2) Lisäämällä vahvempaa metallia kelatoivaa reagenssia irtoavat hartsin kiinnittyneet nikkeli-ionit. (3) Lisäämällä sitoutumisesta kilpailevan komponentin konsentraatiota liikkuvassa faasissa (imidatsoli tai histidiini) syrjäytyy lopulta sitoutunut proteiini. Sitoutumisvoimakkuus proteiinin ja metalli-ionin välillä on riippuvainen affiniteettikahvan pituudesta, sijainnista sekä esillä olosta. Käytettävässä pientä imidatsolikonsentraatiota proteiinin sitoutusvaiheessa, voidaan estää muiden proteiinien epäspesifistä sitoutumista imidatsolin kilpaillessa sitoutumisesta. (HisTrap Affinity Columns 2009, 4–10, 14 ja Switzer & Garrity 1999, 38.)

Teoriassa puhdistus on hyvin yksinkertaista, mutta käytännössä voi esiintyä muutamia ongelmia. Hartsin voimakas, metallia kelatoivan aineen aiheuttama negatiivinen varaus saattaa aiheuttaa kationinvaihtovaikutuksia, mikäli kaikki kelaatiopaikat eivät ole kylläisiä metalli-ionista. Lisäksi usein matriisin ja metalli-ionin välillä käytetyt pitkät sitoutusaineet sitovat proteiineja epäspesifisesti hydrofobisten interaktioiden kautta. Ongelmista huolimatta IMAC on tehokas työkalu monien proteiinien puhdistukseen. (Switzer & Garrity 1999, 38.)

3.3.5 Dialyysi

Dialyysi perustuu liuenneiden aineiden diffuusioon puoliläpäisevän kalvon läpi. Diffuusiosta veteen liuenneet aineet liikkuvat passiivisesti suuremmasta konsentraatiosta pienempään. (Willey, Sherwood & Woolverton 2009, 114.) Puoliläpäisevänä kalvona on materiaali, jossa on vaihtelevan kokoisia huokosia. Puoliläpäisevä kalvo mahdollistaa pienmolekyylien liikkeen kalvon läpi suurempien molekyylien pidätyessä kalvolle sen huokoskoon mukaan. Diffuusion nopeus riippuu konsentraatioerosta kalvon molemmin puolin. Tasapainotilassa, jossa konsentraatioeroa ei enää ole, ei myöskään diffuusiota tapahdu. (Van Holde, Johnson & Ho 1998, 567–568, 573–574.)

Dialyysikalvo valitaan läpäisemään vain osaa liuoksen komponenteista. Kalvon tulee pidättää esimerkiksi proteiini, mutta mahdollistaa muiden liuosten komponenttien liike lävitseen (kuva 5). Dialyysikalvon sisällä tulee vallita eri olosuhteet kuin ympäröivässä liuoksessa, jolloin diffuusio tapahtuu kalvon läpi. Dialyysi soveltuu makromolekyylien puhdistukseen tai puskurinvaihtoon. (Van Holde, Johnson & Ho 1998, 538–539.) Esimerkiksi työssä tehtävän dialyysin tarkoituksena on alentaa imidatsolikonsentraatiota proteiiniliuoksessa. Konsentraatio saadaan alenemaan käyttämällä dialyysipuskuria, jossa imidatsolikonsentraatio on pienempi kuin dialysoitavassa liuoksessa.



KUVA 5. Dialyysi on diffuusiota puoliläpäisevän kalvon läpi. Dialyysimembraani on upotettuna liuokseen, jossa liuenneiden komponenttien konsentraatio on kalvon sisäistä matalampi. Membraanin sisältä virtaa pienmolekyylejä dialyysiliuokseen. Huokosrakenteet pidättävät suuret molekyylit.

3.4 Tuotteen karakterisointi

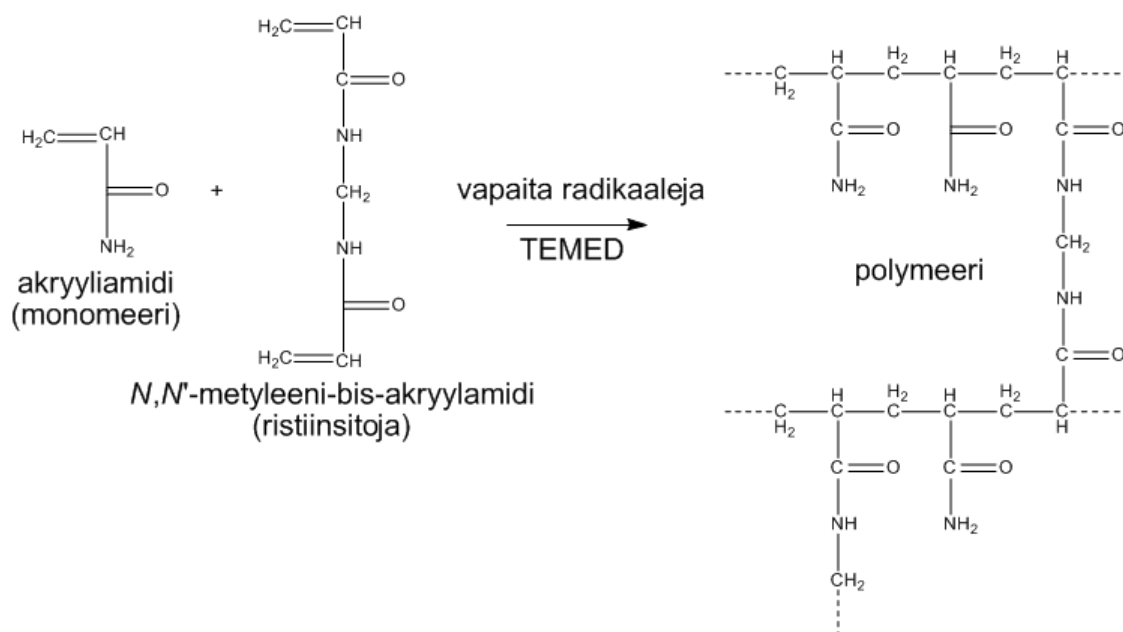
3.4.1 Geelielektroforeesi

Elektroforeesi on prosessi, jossa liuoksessa olevat varautuneet molekyylit kulkeutuvat sähkökentän avustamana. Molekyylin kulkeutumisen nopeuteen vaikuttaa moni muuttuja, kuten molekyylin nettovaraus, käytetty jännite ja kitkakerroin. Elektroforeesit luokitellaan yleensä matriisin mukaan, minkä lävitse varautuneet molekyylit kulkeutuvat elektroforeettisessa systeemissä. Matriisina voi toimia niin kiinteä kuin liuosmuotoinenkin alusta. Matriisi vaikuttaa olennaisesti molekyylin kokemaan kitkakertoimeen. Esimerkiksi proteiinit saadaan erotettua toisistaan niiden koon, muodon ja varauksen perusteella. Elektroforeesi voidaan ajaa niin natiiveissa (ei-denaturoivissa) kuin denaturoivissa olosuhteissa. (Farrell & Ranallo 2000, 207–208 ja Switzer & Garrity 1999, 61.)

Geelielektroforeesissa molekyylit erotellaan puskuriliuosten avulla polymeerisessä geelimatriisissa. Geelielektroforeesin etuina ovat mahdollisuus erotella suuriakin molekyylejä ja geelialustan muokkailtavuus. Runsaasti polymeroituneessa geelissä suuri kitkakerroin toimii molekyylisiivilän tavoin. Molekyylisiivilällä tarkoitetaan tilannetta, jossa viskositeetti ja geelin huokoskoko pääasiassa määrittävät elektroforeettisen liikkeen nopeuden ja molekyylien liikkumisen. Siivilöytymisestä johtuen makromolekyylien liike johtuu pääasiassa niiden molekyylipainosta. (Switzer & Garrity 1999, 65.)

Natriumdodekyyli-sulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE) on erityisesti proteiinien erottamiseen kehitetty menetelmä, joka erottelee proteiinit ainoastaan niiden molekyylipainon perusteella. Matriisina menetelmässä toimii ristiinsitoutunut polymeeri, polyakryyliamidi (PA). PA-polymeeri muodostuu akryyliamidin ja ristiinsitovan N,N'-metyleeni-bis-akryyliamidin välille vapaita

radikaaleja muodostavan systeemin läsnä ollessa. Vapaita radikaaleja saadaan muodostumaan ammoniumpersulfaatin (APS) avulla käytettäessä reaktiota katalysoivaa N,N,N',N'-metyylietyylidiamiinia (TEMED) (kuvio 4). (Switzer & Garritty 1999, 68.)



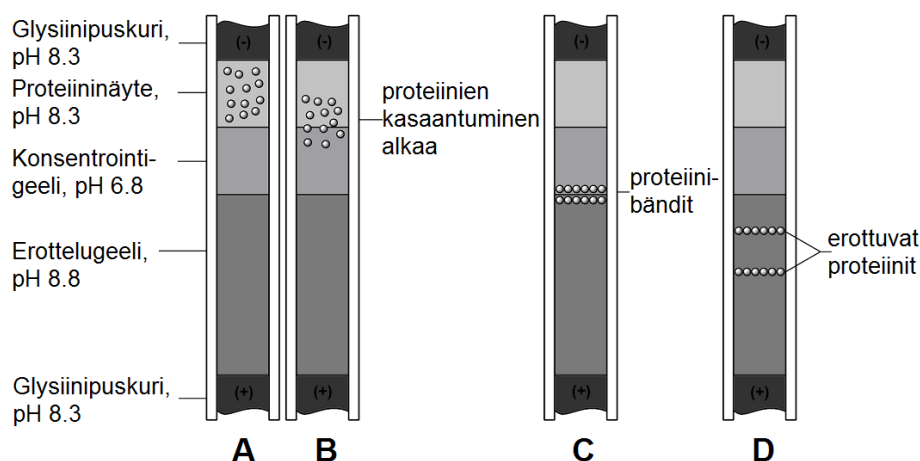
KUVIO 4. Polyakryyliamidigeelin muodostuminen. Vapaiden radikaalien muodostuminen saa polymeroitumisreaktion aikaan. N,N'-metyyleeni-bis-akryyliamidi sitoo akryyliamidimonomeerit ristiin kiinni toisiinsa.

Natriumdodekyylisulfaatti (SDS) on ioninen denaturoiva detergentti, joka sitoutuu proteiineihin tietyllä suhteella, noin 1,4 g kohti yhtä grammaa denaturoitua proteiinia. SDS sitoutuu kaikkialle proteiiniin tuhoten useimmat ei-kovaleentiset molekyylien väliset ja -sisäiset vuorovaikutukset proteiinissa eliminoi den proteiinin natiivit sekundääri-, tertiääri- ja kvaternäärirakenteet. Ilman SDS:ää molekyyllipainoltaan samanlaiset, mutta laskosrakenteeltaan poikkeavat proteiinit etenisivät PA-geelillä toisistaan poikkeavalla tavalla. Liukoinen tioli (β -merkaptetanoli tai ditiotreitoli) poistaa lisäksi disulfidisidokset, joita saattaa löytyä molekyylien sisältä tai väliltä. Käytettäessä molempia reagensseja ja kuumaa lämpötilaa näytteen valmistuksessa saadaan aikaan täysin denaturoitunut proteiini avautuneessa ja negatiivisesti varautuneessa polypeptidiketjuisessa muodossaan. (Switzer & Garritty 1999, 68 ja van Holde, Johnson & Ho 1998, 222–224, 226.)

Anioniset polypeptidiketjut erotetaan toisistaan elektroforeettisesti PA-geelillä, puskurissa, joka mahdollistaa jännitteen kulkeutumisen. SDS:ää on mukana niin geelissä kuin puskurissakin, mikä auttaa ylläpitämään proteiinien negatiivista varausta. SDS-päälysteisissä polypeptideissä varaus-massa-suhde on lähes vakio. Molekyylien kokema kitka niiden liikkuesssa geelin läpi kohti positiivista napaa on suurin niiden liikkuvuuteen vaikuttava tekijä. Tämän lisäksi liikkumiseen vaikuttaa geelin huokoskoko: suurempiin polypeptideihin kohdistuu enemmän kitkaa kuin pienempiin polypeptideihin. (Switzer & Garrity 1999, 68–69.)

Yleisesti käytössä oleva SDS-PAGE-menetelmä käyttää hyväkseen kahta puskuri-polyakryyliamidi-koostumusta yhdellä geelillä, niin sanottua epäjatkovaa puskurijärjestelmää. Proteiininäytteet applikoidaan kaivoihin, kun niihin on sekoitettu viskositeettia lisäävää glyserolia ja jännitettä syötetään systeemiin. Jännite kulkee geelin läpi kahden toisistaan erotetun puskurialtaan kautta (kuva 6, A, s. 33). (Switzer & Garrity 1999, 69–70.) Proteiinien kulkeutumista voidaan tarkkailla näytepuskuriin lisättävällä väriaineella, bromifenolisinisellä (3',3'',5',5''-tetrabromifenolisulfonftaleeni), joka pienenä negatiivisesti varautuneena molekyylinä kulkee proteiininäytteen edellä. (Farrell & Ranallo 2000, 215.)

Elektroforeesin alussa on gradientti, joka kasaa kaikki proteiinit yhtenevästi eteneväksi ja teräväksi bändiksi. Terävöityminen tapahtuu geelin alkuosassa, konsentroitigeelissä (ylägeeli). Saavuttaessaan tiheämmän erottelugeelin polypeptidien liike hidastuu (kuva 6, B, s. 33). Kitkakerroin kasvaa huokoskoon pienetessä, mistä johtuen proteiinit kasaantuvat teräväksi vyöhykkeeksi kohdattaessaan tiheämmän erottelugeelin (alageeli) (kuva 6, C, s. 33). Proteiinit kulkeutuvat nyt geelillä massansa mukaisesti tasalaatuisessa glysiinipuskurissa, sillä niiden massa-varaus-suhde on lähes vakio (kuva 6, D, s. 33). (Switzer & Garrity 1999, 69–70 ja van Holde ym. 1998, 226–227.)



KUVA 6. Proteiinien liikkuminen konsentroidingeelin ja erottelugeelin läpi SDS-PAGE-ajossa (Switzer & Garrity 1999, 69, muokattu)

3.4.2 Proteiinien visualisointi

Geelillä erotellut proteiinit voidaan visualisoida usealla tavalla. UV-valossa proteiinit absorboivat lähellä 280 nm aallonpituutta. Geelien visualisointiin on myös kehitetty muita tekniikoita. Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) on sininen väriaine. CBB:llä värjäämällä geeliltä voidaan saada esiin proteiini-bändit. CBB-väriliuoksessa on mukana metanolia ja etikkahappoa, jotka kiinnittävät proteiinit geeliin kiinni ja CBB-väriaine sitoutuu proteiineihin. Coomassie Blue:n on osoitettu sitoutuvan happamissa olosuhteissa emäksisiin aminohappotähteisiin, kuten arginiiniin, lysiiniin ja histidiiniin, mutta reagoivan heikosti myös tryptofaanin, tyrosiinin, fenyyialaniinin kanssa. (Protein Gel Stains 2011.)

Geelille voidaan tehdä värinpoisto samalla värjäysliuoksella, jossa ei ole CBB-väriä. Värinpoistossa geeliin sitoutunut väri huuhtoutuu pois niiltä kohdin, missä sitoutunutta proteiinia ei ole. Proteiinit visualisoituvat geelille tummansinisinä bändeinä. Värimenetelmän herkkyys on riittävä detektoimaan jopa bändin, jossa on 0,1–0,5 µg polypeptidiä. Proteiineja on mahdollista detektoida vielä herkemmällä metodeilla, esimerkiksi hopeavärjäyksellä, jossa yhden havaitun bändin proteiinipitoisuus voi olla vain esimerkiksi 10 ng. (Protein Gel Stains 2011 ja Switzer & Garrity 1999, 71.)

3.4.3 Western blot

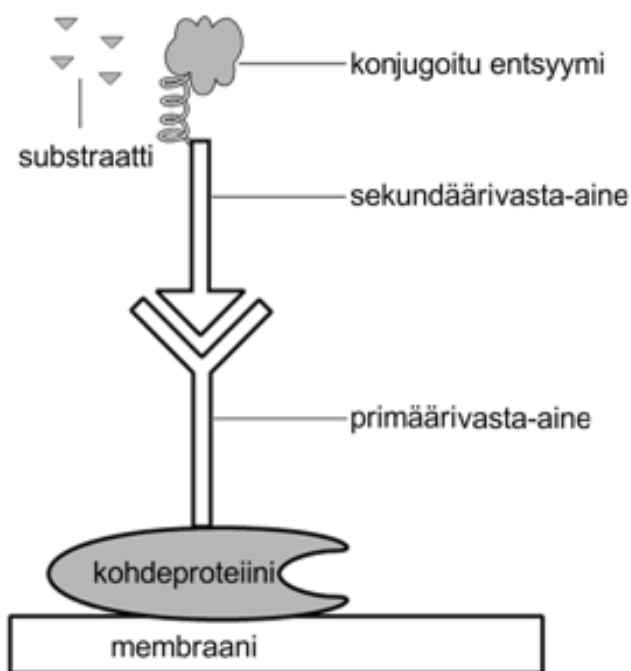
Western blot -menetelmä on yksi laajimmiten käytetyistä immunokemiallisista tekniikoista biokemiassa. Yleisesti western blot -menetelmää käytetään havainnoimaan tietty proteiini antigeeniseoksesta. Tekniikan avulla voidaan saada kvalitatiivista, kvantitatiivista ja struktuurista tietoa proteiinista: onko proteiinia havaittavissa, kuinka paljon sitä on ja mikä on sen molekyylimassa. (Switzer & Garrity 1999, 271.) Tekniikan avulla voidaan havainnoida mikä tahansa proteiini, mikäli sille sopiva vasta-aine on olemassa (Switzer & Garrity 1999, 291).

Western blot -menetelmä etenee yleisesti seuraavalla tavalla. Ensimmäiseksi proteiinit erotellaan SDS-PAGE:n avulla. Tämän jälkeen geelille erottuneet proteiinit siirretään membraanille, jota inkuboidaan epäspesifisen proteiinin kanssa proteiinia sisältämättömien kohtien peittämiseksi. (Switzer & Garrity 1999, 271.) Käytettäväksi epäspesifiseksi proteiiniksi sopii esimerkiksi rasvaton maitojauhe, kaseiini tai naudan seerumin albumiini. Mikäli blokkaukseksi kutsuttua vaihetta ei suoriteta, vasta-aineet voivat sitoutua membraanin eri kohtiin satunnaisesti, mikä vaikeuttaa kohdeproteiinin havaitsemista. (Switzer & Garrity 1999, 291.)

Kohdeproteiinit todetaan primäärivasta-aineella, jonka sitoutuminen on spesifistä. Membraania huuhdellaan, kun vasta-aineen on annettu vaikuttaa riittävän kauan. Huuhtelemalla päästään eroon membraaniin sitoutumattomasta ja ylimääräisestä vasta-aineesta. Pesu suoritetaan puskurilla, jossa on polyoksietyleenisorbitaania (Tween-20). Tween-20 on ioniton detergentti, joka poistaa hydrofobiset vaikutukset primäärin vasta-aineen ja muiden kuin kohdeproteiinin väliltä, auttaen näin membraanin pesua. (Switzer & Garrity 1999, 291–292.)

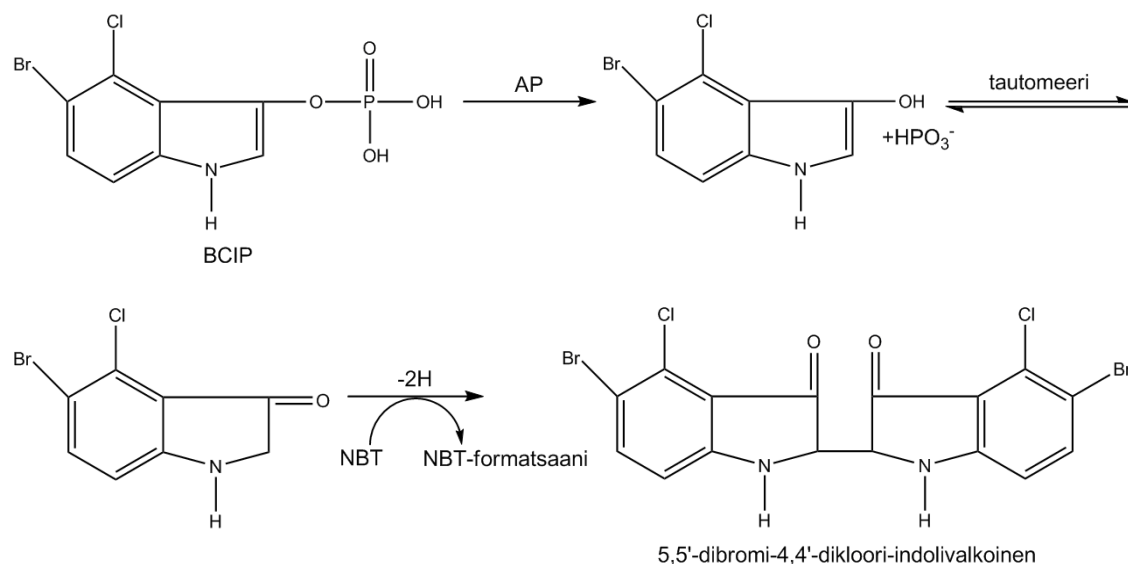
Entsyymikonjugoitu sekundäärivasta-aine tunnistaa primäärivasta-aineen suurella affiniteetilla. Entsyymikonjugaatteja ovat esimerkiksi alkalinen

fosfataasi (AP) ja piparjuuri-peroksidaasi. (Switzer & Garrity 1999, 271). Sitoutumaton sekundäärivasta-aine huuhdellaan pois membraanilta hetken inkubaation jälkeen Tween-20:ntä sisältävällä puskurilla (Switzer & Garrity 1999, 292–293). Sekundäärivasta-aineeseen konjugoidun entsyymin substraattia lisätään membraanille, jolloin entsyymi-substraatti-reaktion myötä syntyy havaittava sakka tai valoreaktio (Switzer & Garrity 1999, 272). Kuvassa 7 on esitetty kohdeproteiinin detektointi western blotilla.



KUVA 7. Western blot -detektio. Kohdeproteiini tunnistetaan membraanilta primäärivasta-aineen avulla. Sekundäärivasta-aine tunnistaa edellisen vasta-aineen ja siihen konjugoitu entsyymi aiheuttaa reaktion substraattia lisättäessä.

Käytettäessä sekundäärivasta-ainetta, johon on konjugoitu alkalinen fosfataasi entsyymi, voidaan kohdeproteiini havaita käyttämällä nitrosinitetratsoliumia (NBT) ja 5-bromi-4-kloori-3'-indolifosfaattia (BCIP). Alkalinen fosfataasi aiheuttaa kemiallisen reaktion, jossa BCIP:stä hydrolysoituu fosfaattiryhmä, jolloin muodostuu välituote. Välituote hapettuu ja dimerisoituu muodostaen purppuran värin, diklooribromi-indigon. NBT pelkistyy NBT-formatsaaniksi dimerisoitumisessa muodostuvien pelkistäjien avulla, jolloin syntyy liukene-maton violetti väri, diformatsaani (kuvio 5, s.36). Reaktio tapahtuu tasaisella nopeudella, mistä johtuen reaktion kulku voidaan pysäyttää halutussa vaiheessa. (Pierce NBT/BCIP Substrates and Solutions 2011.)



KUVIO 5. Purppuran värin muodostuminen alkalisen fosfataasin katalysoimassa reaktiossa BCIP:n ja NBT:n välillä (Pierce NBT/BCIP Substrates and Solutions 2011, muokattu)

3.4.4 Geelisuodatus

Geelisuodatuksen (GF) avulla molekyylejä voidaan erotella niiden koon mukaisesti. GF-kolonnissa on ristiinsidottua huokoista geeliä, jonka ristiinsituminen on vaihtelevaa. Pallomaisesti rakentunut matriisi on sekä fysikaalisesti että kemiallisesti inertiä. Toisin kuin muissa kromatografisissa menetelmissä geelisuodatuksen aikana molekyylit eivät sitoudu matriisiin, joten puskurin koostumus ei vaikuta suoraan erottumiseen. Huokoisen matriisin sisälle pääsevät tietyt kokoiset molekyylit, kun taas toiset eivät mahdu huokosten sisään lainkaan, eli ne ekskluoituvat. Yleisesti geelisuodatuskolonneihin on merkittynä niiden ekskluusiorajat, jotka kertovat huokosiin mahtuvan molekyylin maksimikoon. Esimerkiksi jos ekskluusiorajaksi on kerrottu 60 000 Da, sitä suuremmat molekyylit kulkeutuvat kolonnin huokosten ohi ja muut pidättyvät matriisiin. (Gel Filtration 2010, 9; Farrell & Ranallo 2000, 157–158, Switzer & Garritty 1999, 27–28.)

Molekyylin pidäytyminen matriisiin johtuu sen molekyyli­massasta ja muodosta. Molekyylin kulku matriisissa on riippuvainen sen pääsystä matriisiin huokosiin. Pienimmät molekyylit valtaavat koko matriisin kaikki huokosrakenteet. Pääsy huokosrakenteisiin rajoittuu molekyylin kokoon perustuen. Mitä enemmän molekyylin on mahdollista saavuttaa huokosrakenteita, sitä hitaampaa eluutio on. (Gel Filtration 2010, 9–10; Farrell & Ranallo 2000, 157–158 ja Switzer & Garrity 1999, 27–28.)

Yleisesti geelisuodatus suoritetaan isokraattisella eluentilla, eli liikkuvan faasin koostumus pysyy vakiona. Geelisuodatusta käytetään kooltaan toisistaan suuresti eroavien molekyylien erottamiseen, mutta sitä voidaan käyttää myös puskurinvaihtoon, mikäli käytettävissä on sopiva kolonni. Geelisuodatuksen avulla voidaan selvittää natiivin proteiinin molekyyli­massa. Etuna menetelmässä on mahdollisuus näytteen talteenottoon. (Farrell & Ranallo 2000, 157–158 ja Switzer & Garrity 1999, 29.)

3.4.5 Differentiaalinen pyyhkäisykalorimetria

Differentiaalisen pyyhkäisykalorimetrian (differential scanning calorimetry, DSC) avulla voidaan mitata lämpötilan muutosta näytteessä. Lämpötilan mittauksen lisäksi DSC:llä voidaan mitata lämpövirtausmääriä ja reaktio- tai siirtymä­lämpötiloja eli lämpökapasiteetin muutosta näytteessä. DSC voitaisiin määritellä seuraavasti: referenssinäytteen ja näytteen lämpövirtausmäärän muutoksen mittaaminen kontrolloiduissa lämpötilaolosuhteissa. (Höhner ym. 2003, 1.) Lämpötilasta aktivoituvien reaktioiden tai siirtymien kohdalla näytteen lämpökapasiteetti muuttuu ja aiheuttaa DSC-signaalin (Höhner ym. 2003, 2).

DSC soveltuu erittäin pienille näytemäärille. Laajan käytettävissä olevan lämpötila-alueen ja mittauksen tarkkuuden avulla DSC:tä voidaan käyttää muun muassa seuraaviin tarkoituksiin: materiaalien karakterisointi, vertailu- ja

stabiilittemittaukset, faasidiagrammien arviointi, puhtausmääritykset, kineettiset- ja turvallisuustutkimukset ja lämpökapasiteetin mittaaminen. (Höhner ym. 2003, 4.)

DSC-laitteita on kahdentyyppisiä: lämpövu-DSC (heat flux DSC) ja tehokompensaatio-DSC (power compensation DSC), jotka eroavat mittauseriaatteeltaan. Kaikille DSC:lle yhteistä on niiden differentiaalinen (eroavaisuuteen perustuva) mittaustekniikka. Mitattu signaali ilmaistaan suhteessa lämpövirtausmäärään (heat flow rate, Φ) eikä lämpöön, kuten tavanomaisissa kalorimetreissa. Tämän avulla voidaan kartoittaa lämpöriippuvuutta ajan funktiona $\Phi(t)$ -käyrältä. (Höhner ym. 2003, 9.)

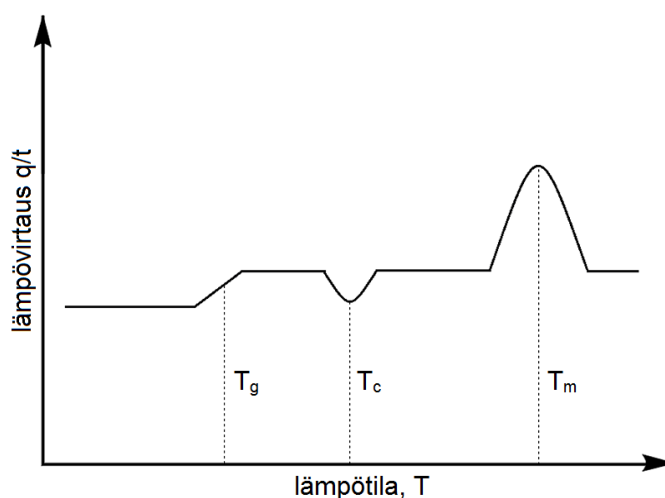
Näytteen lämmittäminen DSC-laitteistoissa vaihtelee laitteen tyypin, sekä näytteen laadun mukaan. Lämpövu-DSC kuuluu lämpöä vaihtavien kalorimetrien joukkoon tehokompensaatio-DSC:n kuuluessa lämpöä kompensoiviin kalorimetreihin. Yleisesti mittaussysteemi koostuu kahdesta identtisestä mikrokokoisesta uunista, jotka ovat termostoidun alumiinikuoren sisässä. Uunit ovat valmistettu reagoimattomista metalleista. Molemmissa uuneissa on lämpötila-sensori, sekä lämmityselementti. (Höhner ym. 2003, 17.)

DSC-laitteistoja käytetään useimmiten tietokonevälitteisesti ohjelmalla, joka muuttaa lämpötilaa ajan funktiona. Lämpötilan muutos voidaan suorittaa vakiona, esimerkiksi tiettyä astemääränä tuntia kohden tai vaihtelevasti muuttamalla lämmitysnopeutta. Esimerkki vaihtelevasta lämmitysmenetelmästä on lämmitys-jäähdytys-menetelmä, jossa näytettä lämmitetään ja jäähdytetään sykleittäin. (Höhner ym. 2003, 25 ja Jelesarov & Bosshard 1999, 10.)

Yksinkertaistettuna DSC:ssä on kaksi näytepidintä, jossa toisessa on näyte ja toisessa ei mitään (jos kyseessä kiinteä näyte) tai näytteen kaltainen matriisi (jos kyseessä nesteessä oleva näyte). Näytepitimiä lämmitetään uunissa tietyllä nopeudella. Molemmat näytepitimet lämmittävät yhtenevästi. Näytepitimien

erosta johtuen näytteen sisältävää näytepidintä täytyy lämmittää voimakkaammin, jotta lämpiäminen molemmissa pitimissä tapahtuu yhtenevästi. DSC mittaa, kuinka paljon enemmän näytettä sisältävää pidintä täytyy lämmittää, kuin referenssipidintä. Lämmittämisestä piirretään kuvaajaa, jossa x-akselille kuvataan lämpötila ja y-akselille kahden näytteenpitimen lämmöntuoton välinen ero tietyssä lämpötilassa, eli lämpövirtaus. (Polymer Science Learning Center 2005.)

Tyypillisesti polymeerejä lämmitettäessä lämpövirtauskuvaajalta on erotettavissa kolme lämpösiirtymää. Ensimmäinen siirtymä on lasittumispiste (T_g). Lasittumispisteessä aineen lämpökapasiteetti muuttuu. Kristalloitumispiste (T_c) saavutetaan molekyylien järjestyessä yhtenäiseen rakenteeseen. Viimeistä lämpösiirtymää (T_m) kutsutaan sulamiseksi. Sulaminen on endoterminen reaktio. (Polymer Science Learning Center 2005.) Biomolekyyleille kyseisestä siirtymätilasta voidaan käyttää myös termiä denaturaatio. Siirtymätilan keskikohdassa 50% proteiinista on laskostuneessa muodossaan ja 50% denaturoitunut. Mitä korkeampi T_m -arvo on, sitä stabiilimpi biomolekyyli. (MicroCal Inc. 2008a.) Proteiineilla havaitaan lisäksi usein denaturaation jälkeinen aggregaatioprosessi, joka on eksoterminen (Jelesarov & Bosshard 1999, 10). Kuviossa 6 on esitetty lämpösiirtymien aiheuttamat muutokset lämpövirtauskuvaajalla.



KUVIO 6. Lämpövirtauskuvaajalta havaittavat muutokset: lasittumispiste (T_g), kristalloitumispiste (T_c) ja sulamispiste (T_m)

3.4.6 Isoterminen titrauskalorimetria

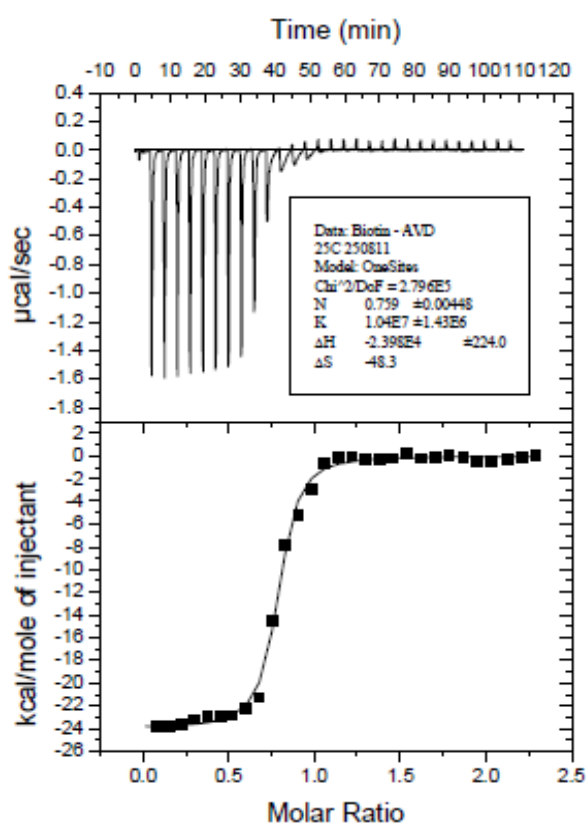
Isoterminen titrauskalorimetria (isothermal titration calorimetry, ITC) on termodynaaminen menetelmä, jonka avulla voidaan mitata molekyylien sitoutumiseen liittyvää lämpötilan muutosta. Lämpötilan muutoksen mittaamisen avulla voidaan yhdellä mittauksella tarkasti määrittää sitoutumiseen liittyviä muuttujia, kuten sitoutumisvakio tai sitoutumisaffiniteetti (K_B tai K_d) välillä millimolaarisesta nanomolaariseen, reaktion stoikiometria (n), eli sitoutumispaikkojen määrä, entalpia (ΔH) ja entropia (ΔS). (Leavitt & Freire 2001, 560 ja MicroCal Inc. 2008b.)

ITC:n sovellutuksiin kuuluvat muun muassa molekyyli-interaktioiden tutkiminen pienmolekyyleillä, proteiineilla, vasta-aineilla, nukleiinihapoilla, lipideillä ja muilla biomolekyyleillä. Lisäksi ITC:tä voidaan käyttää molekyyliumuokkauksen optimisointiin (lääkekehitys), entsyymikinetiikkaan, biologisen aktiivisuuden ja molekyyliarakenteen vaikutuksen sitoutumismekanismeihin tutkimiseen. Minkä tahansa kahden molekyylin välisiä lämpöä sitovia tai tuottavia interaktioita voidaan tutkia, kuten proteiini-pienmolekyyle, proteiini-proteiini, lääke-reseptori, entsyymi-inhibiittori, vasta-aine-antigeeni, proteiini-DNA, proteiini-lipidi ja pienmolekyyle-pienmolekyyle. (Leavitt & Freire 2001, 564 ja MicroCal Inc. 2008b.)

Entropia (S) ja entalpia (H) kuvaavat voimia, jotka edistävät kompleksin muodostumista ja sen tapahtumisen mekanismeja. Termodynaamisen datan avulla saadaan tietoa konformaation muutoksista, vetysidoksista, hydrofobisista vuorovaikutuksista ja varauksista johtuvista interaktioista. Kaikki interaktiot yhdessä kuvaavat toimintaa ja mekanismeja molekyyllitasolla. (MicroCal Inc. 2008b.)

Tavallisessa ITC-kokeessa yhden biomolekyylin liuosta (ligandia, kuten proteiinia, lääkeainetta, ja niin edelleen.) titrataan näytesoluun tasaisina määrinä (kuvio 7, s. 41). Näytesolussa on titrattavan biomolekyylin reseptori

liuosmuodossa. Koko prosessi tapahtuu vakio­lämpötilassa. Molekyylien reagoi­des­sa näy­teso­lus­sa vapautuvaa tai sitoutuvaa lämpöä (ΔH) tark­kaillaan ajan funk­tiona. Lämpömuutosta verrataan referenssisoluun, jossa on pelkkää puskuria. Lämpötilan muutosta ilmaistaan sähköenergi­ana (J/s), jota tarvitaan ylläpitämään jatkuva pieni lämpötilaero näy­teso­lun ja referenssiso­lun välillä. Molemmat solut ovat adiabaattisen vaipan sisällä. (Jelesarov & Bosshard 1999, 5 ja MicroCal Inc. 2008b.) Kuviossa 7 on esitetty esimerkkinä aidiini­nin titraus biotiinilla.



Data: 200 µM Btn – 20 µM Avid	
25 °C 250811	
n	0,759
K_B	$1,04 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$
K_d	$9,615 \times 10^{-8} \text{ M}$
ΔH	$-2,398 \times 10^4 \text{ kcal/mol}$
ΔS	$-48,3 \text{ eu (cal/K/mol)}$

KUVIO 7. Esimerkki ITC:n tuottamasta datasta: titraus biotiinilla aidiiniin. Ylhäällä lämpötilan muutos titrattaessa ligandia (biotiini) sitä sitovaan molekyyliin (aidiini). Alhaalla on lämpötilan ja ligandi-reseptori-suhteen avulla piirretty sitoutumiskuvaaja. Oikealla on taulukoituna saadut tulokset. Huomio, katso sivulta 73 dissosiaatiovakioista.

Titrauksesta muodostuvat piikit (kuvio 7, ylempi kuvaaja) kuvaavat ligandin injektion aiheuttamaa muutosta solun lämpötilassa. Muodostunut lämpö saadaan laskemalla injektion muodostaman piikin pinta-ala. Peräkkäisten titrausten jatkuessa sitoutunut tai tuotettu lämpötila on suorassa suhteessa ligandin sitoutumisen määrään. Systemin lähestyessä saturaatiota (kaikkien

sitoutumispaikkojen täyttyessä) lämpösignaali alkaa vähetä, kunnes havaitaan ainoastaan laimentumisesta tai mekaanisista vaikutuksista johtuvaa lämpötilan muutosta. (Jelesarov & Bosshard 1999, 5; Leavitt & Freire 2001, 560 ja MicroCal Inc. 2008b.)

Sitoutumiskuvaaja saadaan aikaan vertaamalla injektioiden tuottamia lämpötiloja ligandin ja sitä sitovan molekyylin suhteeseen näytesolussa. Sitoutumiskuvaaja analysoidaan käyttäen sopivaa sitoumismallia sitoutumisvakion (K_B) määrittämiseksi. (Jelesarov & Bosshard 1999, 5 ja MicroCal Inc. 2008b.) Dissosiaatiovakio (K_d) voidaan laskea yhtälössä 1 esitetyn kaavan mukaan:

$$K_d = 1/K_B. \quad (1)$$

Luotettavien sitoutumisvakioiden saamiseksi ligandin ja sitojan konsentraatioiden tulee olla oikeassa suhteessa, ligandia tulee olla vapaana sekä komplekseja muodostua. Mikäli sitoutumispaikkojen konsentraatio on liian suuri koko mittauksen ajan, kaikki lisätty ligandi sitoutuu titrattaessa. Sitoutumiskuvaaja lähenee äärettömyyttä, koska saturaatiota ei saavuteta. Vastakkaisessa tilanteessa sitoutumispaikkojen konsentraation ollessa vähäinen, sitoutumiskuvaaja on hyvin loiva. Loivasta sitoutumiskuvaajasta on hankala määrittää saturaatiota. Erittäin tiukkaa sitoutumista on vaikea määrittää ITC:n avulla. On kuitenkin mahdollista titrata tiukasti sitoutuvaa ligandia liuokseen, jossa sen reseptori on jo kyllästetty heikosti sitoutuvalla ligandilla. (Jelesarov & Bosshard 1999, 6–7.)

4 TUTKIMUKSEN TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena on tuottaa uutta tietoa avidiinin steroidisitomiskyvyn aiheuttavien mutaatioiden ja steroideja sitoviin avidiineihin tehtyjen uusien pistemutaatioiden vaikutuksesta (1) proteiinin tuottoon, (2) stabiiliuteen ja (3) sitomisspesifiteettiin. Tarkoituksena on kartoittaa vaikuttavatko uudet tehdyt pistemutaatiot proteiinien kykyyn sitoa eri ligandeja: testosteronia, progesteronia ja biotiinia, ja saadaanko mutaatioilla aikaan parempi lämpökestävyys proteiineille. Tarkoituksena on myös vertailla kuinka uusien mutaatioiden saaneet proteiinit ekspressoituvat *E. coli* -bakteerisoluihin. Tutkimuksen kohteena steroideja sitovien avidiinimutanttien pistemutaatiot paikassa 117 tai 118. Paikkaan 117 isoleusiini on muutettu tyrosiiniksi ja paikassa 118 asparagiini asparagiinihapoksi. Pistemutaatioiden vaikutusta verrataan proteiineihin ilman lisämutaatioita ja täysin mutatoimattomaan villityypin avidiini -proteiiniin.

5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

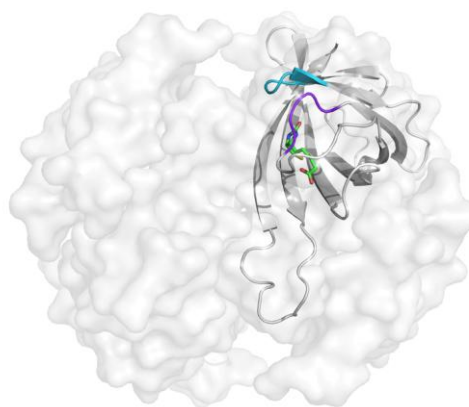
5.1 Aineisto ja lähtökohdat kokeelliselle osalle

Satunnaistamalla avidiinin ligandinsitomispaikan silmukoiden sekvenssejä on saatu aikaan steroideja sitovia avidiini-proteiineja. Satunnaismutageneesillä tehdyt mutaatiot avidiinin silmukkaan 1–2 saivat aikaan testosteronia sitovan proteiinin, jota tässä työssä kutsutaan nimellä Tes29. Tes29:ää varten aminohapposekvenssiä on satunnaistettu välillä 12–16 (kuva 8, s. 45 ja 9, s. 46). Tes29:n pohjalle tehdyistä silmukkarakenteen 3–4 satunnaismutageneesistä saatiin faagidisplay-menetelmän avulla seulottua avidiinimutantti, jolla testosteronin sitoutumisen lisäksi biotiinin sitomiskyky on huomattavasti heikennyt verrattaessa Tes29:ään. (Riihimäki ym. 2011, 1.) Rakennetta on satunnaistettu aminohapoista 35–38 (kuva 8, s. 45 ja 9, s. 46). Uutta avidiinia kutsutaan satunnaistetun sekvenssin uusien aminohappojen mukaisesti Tes29+ATVN:ksi, lyhemmin tässä ATVN:ksi. ATVN:n on huomattu pystyvän sitomaan myös muita steroideja, esimerkiksi progesteronia. (Riihimäki ym. 2011, 4.)

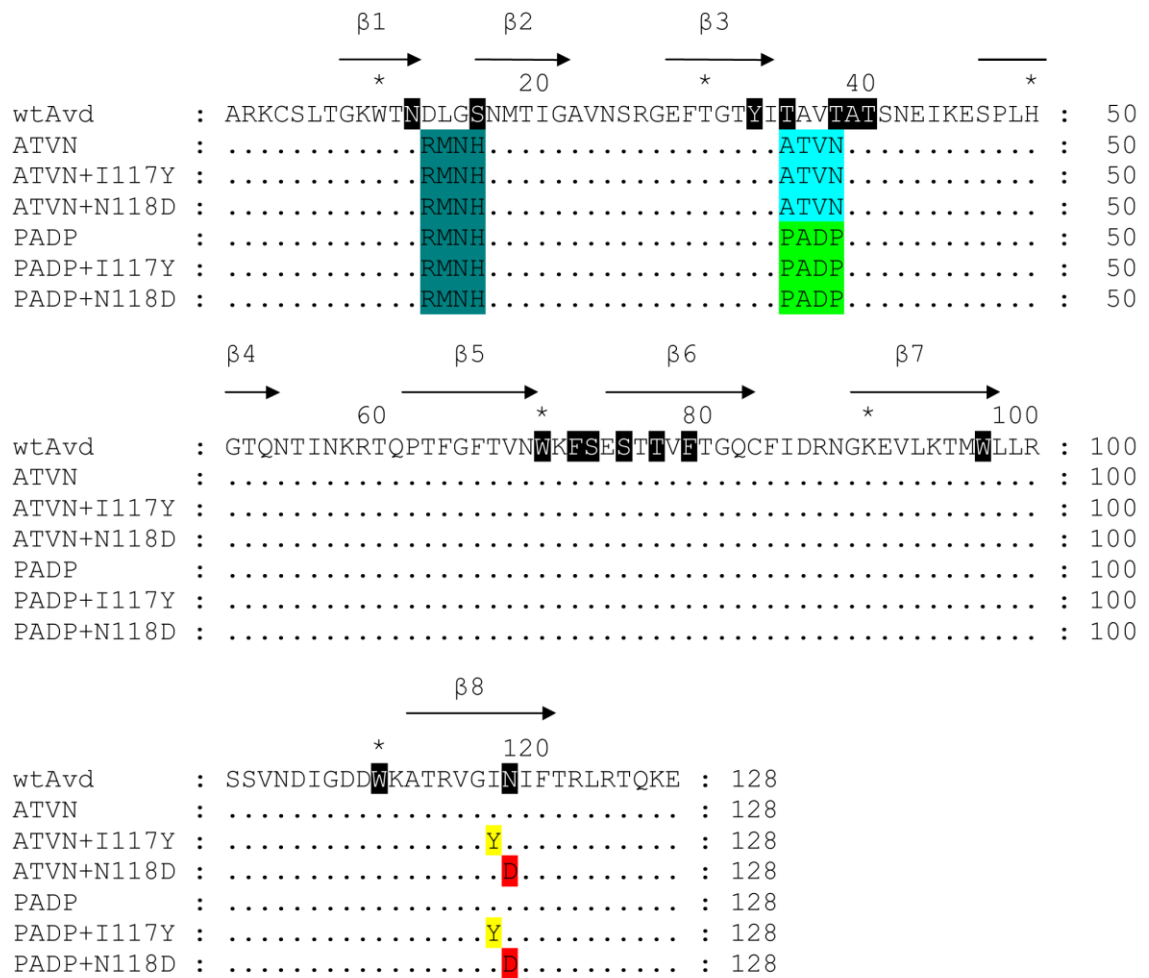
Tässä opinnäytetyössä on jatkettu Riihimäki ym. (2011) tekemää tutkimusta steroideja sitovista avidiini-proteiineista. ATVN-mutanttiin on tehty uusia pistemutaatioita, joiden vaikutusta proteiinin toimintaan tutkitaan. Tietokone-mallinnusten perusteella odotetaan pistemutaation I117Y nostavan proteiinin lämpöstabiliteettia ja pistemutaation N118D suosivan testosteronin sitoutumista ligandinsitomispaikkaansa progesteronin sijaan. Aiemmin on osoitettu pistemutaation I117Y parantavan avidiinin lämpöstabiliteettia (Hytönen 2005a, 10231).

Tutkimuksen kohteeksi valittiin ATVN:n lisäksi samasta testosteronisitojan affiniteettimaturaatiokirjastosta myöhemmin valikoitunut Tes29+PADP (Hiltunen ym. käsikirjoitus valmisteilla). PADP-sekvenssi korvaa ATVN-sekvenssin (kuva 8 ja 9, s. 46) ja proteiinia kutsutaan tässä sekvenssinsä mukaisesti PADP:ksi. Myös tälle proteiinille on tehty erikseen pistemutaatiot I117Y ja N118D. Kuvassa 9 (s. 46) on verrattu steroidia sitovien avidiinien ATVN ja PADP sekä niiden pistemutanttien (I117Y ja N118D) aminohapposekvenssejä villityypin avidiinin aminohapposekvenssiin. Kuvassa 8 on esitetty satunnaismutageneesille altistettut silmukat avidiinin tetrameerisessä rakenteessa.

Pistemutanttien vertailukohtina toimivat täysin mutatoimaton bakteerissa tuotettu villityypin avidiini (kuva 9, s. 46) sekä steroideja sitovat proteiinit ATVN ja PADP ilman uusia pistemutaatioita. Kaikki verrokkiproteiinit on aiemmin tuotettu bakteerisoluihin ja puhdistettu. Kaikissa käytettävissä proteiineissa on liitettyä *Bordetella avium* -bakteerin OmpA-signaaliptidi, joka mahdollistaa proteiinin erittymisen solun periplasmiseen tilaan (Hytönen ym. 2004, 385). Lisäksi proteiineissa on mukana polyhistidiinipuhdistuskahva. Plasmidia, johon on liitettyä proteiinia koodaava geeni, signaaliptidi ja puhdistuskahva kutsutaan yleisesti konstruktiksi.



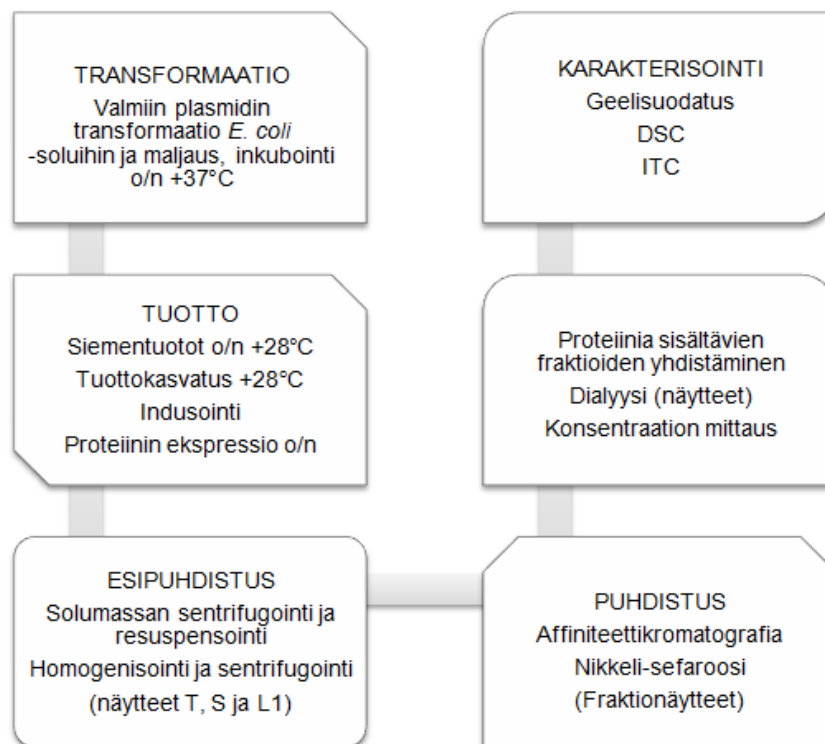
KUVA 8. Villityypin avidiinin kolmiulotteinen rakenne, johon on merkitty satunnaismutageneesille kohdennetut silmukat. Tetrameerisen villityypin avidiinin rakenne sitoutuneella biotiinimolekyyllä (tikkumalli), missä on korostettuna yhden monomeerin rakenne (harmaa). Työhön valitut satunnaistetut aminohappotähteet olivat N12, D13, L14, G15 ja S16 (sininen) β -juosteiden 1 ja 2 välisessä silmukassa ja T35, A36, V37 ja T38 (violetti) β -juosteiden 3 ja 4 välisessä silmukassa. (Riihimäki ym. 2011, 3.)



KUVA 9. Työssä tutkittujen proteiinien sekvenssit rinnastettuna villityypin avidiinin (wtAvd) aminohapposekvenssiin. Biotiinin kanssa sidoksia muodostavat aminohapot on korostettu mustalla. Sekvenssin eroavaisuudet mutaatioissa on korostettu värein. β-juosteita muodostavat aminohapot on merkitty kuvaan nuolilla. Pisteet kuvaavat aminohapporakenteen identisyyttä. (Hiltunen 2011.)

5.2 Työn suorituksen kuvaus

Työn suoritusprosessi eteni kappaleen kuvailemalla tavalla seuraavasti. Avidiini mutanttia tuottavat geenit oli valmiiksi kloonattu pET101D-TOPO®-vektoriin (Invitrogen) ja monistettu Champion™ TOP10 *E. coli* -soluissa (Invitrogen). Monistetut plasmidit oli tämän jälkeen puhdistettu käyttäen GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit -puhdistuskittiä (Fermentas). Tämä työ aloitettiin transformaatiolla, jossa plasmidit transformoitiin kompetentteihin BL21AI™ *E. coli* -soluihin ja maljattiin elatusainemaljoille. Kasvatetulta maljalta valittiin puhdasviljelmään muutamia pesäkkeitä. Puhdasviljelmän avulla aloitettiin tuottokasvatus. Tuotetut solut puhdistettiin ensin kasvatusliuoksesta ja tämän jälkeen solujen sisältämä proteiini affiniteettikromatografian avulla. Jatkotutkimuksia varten tuli proteiinin puskurin koostumusta muuttaa dialyysin avulla proteiinkonsentraation selvittämiseksi. Tuoton ja puhdistuksen jälkeen proteiinista selvitettiin sen oligomeerisyys, lämpöstabiilius ja sitoutumisaffiniteetti eri ligandeihin: biotiiniin, testosteroniin ja progesteroniin. Kuvioon 8 on koottu kokonaisuudessaan työn etenemisprosessi.



KUVIO 8. Työn suorituksen vaiheet

5.3 Transformaatio *E. coli* -soluihin ja proteiinin ekspressio

Proteiinien tuottokonstruktit oli valmiiksi transformoitu pET101/D-TOPO[®]-vektorissa (Invitrogen) ensin Champion[™] TOP10 *E. coli* -soluihin (Invitrogen), minkä jälkeen niiden plasmidi-DNA oli eristetty käyttäen GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit -plasmidipuhdistuskittiä (Fermentas). Tämä työ aloitettiin transformaatiolla. Työn suoritus tehtiin mukaillen Invitrogenin transformaatio- ja solukasvatusohjetta (Invitrogen 2010a, 5, 7, 9). Plasmidi transformoitiin BL21-AI[™] kemiallisesti kompetentteihin *E. coli* -soluihin (omavalmisteiset solut) lämpöshokin avulla. Transformoituja soluja kasvatettiin ensin tunti ravinnerikkaassa SOC-elatusaineessa +37 °C:ssa. Soluja maljattiin antibiootteja (ampisilliini 100 µg/ml ja tetrasykliini 50 µg/ml) ja glukoosia (0,1% w/v) sisältäville LB-agar elatusainemaljoille. Maljoja inkuboitiin lämpökaapissa yön yli +37 °C:ssa.

Maljoilta valittiin yksittäisiä pesäkkeitä jatkokasvatukseen. Siemenkasvatusvaiheessa yksittäinen maljalta valittu pesäke lisääntyy pienessä elatusainemäärässä koeputkessa. Siemenkasvatusmediumi sisälsi samat antibiootit ja glukoosin kuin kasvatusmalja. Siemenkasvatusta inkuboitiin tasoravistelijassa +28 °C:ssa vuorokauden yli.

Tuottokasvatusvaiheessa siemenkasvatus siirrostettiin suurempaan tilavuuteen kasvatusliuosta, jossa antibioottina on ampisilliini ja repressorina glukoosi. Kasvatusta inkuboitiin tasoravistelijassa +37 °C:ssa. Kutakin konstruktia kasvatettiin yhteensä kaksi litraa. Bakteerin kasvua seurattiin spektrofotometrisesti liuoksen optisesta tiheydestä 600 nm (OD_{600nm}) aallonpituudella. Riittävässä bakteeritiheydessä (OD_{600nm} ~0,4) kasvatus indusoitiin L-arabinoosilla (0,2% w/v) ja 1 mM IPTG:llä. Indusoinnin jälkeen proteiinia tuotettiin yön yli +28 °C:ssa.

5.4 Proteiinin puhdistuksen vaiheet

5.4.1 Sentrifugointi ja homogenisointi

Yön yli proteiinia tuottaneiden solujen proteiinin tuotto pysäytettiin sentrifugoimalla solumassa pohjaan +4 °C:ssa, 5000 rpm kierrosnopeudella. Sentrifugoimalla päästään eroon ylimääräisestä elatusaineesta ja kasvaneet solut saadaan sedimentoitua astian pohjalle. Kohdeproteiinin tuottuessa solun periplasmiseen tilaan täytyy solut hajottaa ennen kuin proteiiniin päästään käsiksi. Sentrifugoinnin jälkeen kunkin konstruktin tuottama solumassa resuspensoitiin 500 ml:aan steriilisuodatettua 20 mM imidatsolipuskuria (20 mM natriumfosfaatti, 1 M natriumkloridi, 20 mM imidatsoli, pH 7,4).

Yhdistetyt proteiinituotot (500 ml:ssa puskuria) homogenisoitiin korkeapaineisella EmulsiFlex[®]-C3-homogenisaattorilla (Avestin, Inc.). Solut sisältävä liuos ajettiin paineen (1000–1500 bar) avulla laitteen läpi kahdesti. Ajettaessa solumassa kahdesti laitteen läpi voidaan olettaa lähes kaikkien solujen hajonneen. Hajonneista bakteerisoluihin kohdeproteiini pääsee ulos liuokseen. Saatua liuosta kutsutaan totaali-liuokseksi (T), se sisältää vielä kaiken alkuperäisen materiaalin: kasvatussolut, vaikkakin hajonneina ja tuotetun proteiinin 20 mM imidatsolipuskurissa.

Homogenisoitu kohdeproteiiniliuos sentrifugoitiin uudelleen +4 °C:ssa, 9600 rpm kierrosnopeudella. Sentrifugoinnin tarkoituksena on kasata rikkoutunut solumateriaali astian pohjalle, niin että kohdeproteiiniliuos (L1) saadaan talteen. Solumassa resuspensoitiin uudelleen pieneen määrään 20 mM imidatsolipuskuria sen proteiinisäällön tarkistamiseksi (S-näyte).

5.4.2 Affiniteettikromatografinen puhdistus nikkeli-sefaroosilla

Esipuhdistettu kohdeproteiiniliuos (L1) puhdistettiin affiniteettikromatografisesti ÄKTApurifier™ (GE Healthcare) korkean erotuskyvyn nestekromatografilla, jossa oli kiinnitettynä paineistettuun näytteen syöttämiseen tarkoitettu 50 ml SuperLoop-pylväs (Amersham Biosciences). Puhdistukseen käytettiin HisTrap FF crude 5ml:n nikkeli-sefaroosi-pylvästä (GE Healthcare). Sefaroosi on GE Healthcaren patentoima affiniteettimatriisi, joka koostuu ristiinsitoutuneista agarosihelmistä, joissa on immobilisoitu kelatoiva ryhmä. Pylväs on ladattu Ni²⁺-ionein. (HisTrap Affinity Columns 2009, 4.) Eluenttina proteiinin sitoutukseen affiniteettipylvääseen käytettiin 20 mM imidatsolipuskuria ja virtausnopeutena 5 ml/min. Prosessia ohjattiin tietokonevälitteisesti Unicorn® 5.2 -ohjelmalla (GE Healthcare).

Proteiini eluoiitiin pylvästä käyttämällä 20 mM:sta 700 mM:een nousevaa imidatsoligradiienttia (HisTrap Affinity Columns 2009, 8). Lisääntyvä imidatsolikonentraatio syrjäyttää lopulta nikkeli-ioneihin sitoutuneen 6xHis-puhdistuskahvallisen proteiinin. Eluoituva liuos kerättiin talteen ja proteiinin eluutioita tarkkailtiin ultraviolettivalodetektorilla, aallonpituudella 280 nm (A_{280}).

5.5 Puhdistuksen seuranta SDS-PAGE:lla ja western blot

Kohdeproteiinin puhtautta ja ekspressiota seurattiin tuottoprosessin aikana tietyissä kohdissa. Ensimmäiset SDS-PAGE-näytteet otettiin homogenisoinnin jälkeisestä totaaliliuoksesta (T). Näytteitä otettiin myös liuoksista L1 ja S. Lisäksi affiniteettipuhdistuksen jälkeisistä fraktioista otettiin näytteet, puhdistuskuvajien mukaan (liite 3). Dialysoiduista proteiineista valmistettiin näytteet (0,15 mg/ml) proteiinien puhtauden lopullista tarkastelua varten. Näytteisiin lisättiin 1:1 2xSDS-PAGE-näytepuskuria (4% w/v SDS, 8% w/v glyseroli, 80 mM Tris-

HCl pH 6,8; 0,02% w/v bromifenolisininen) jossa oli β -merkapttoetanol (4 mM) lisättyä.

Proteiinien kokoa arvioitiin käyttäen proteiinikokostandardia 10–250 kDa (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #SM1811, Fermentas). Menetelmän toimivuuden varmistamiseksi positiivisena kontrollina käytettiin villityypin avidiinia. Geelit koostuivat 5%:sta konsentroitigeelistä ja 15%:sta erottelugeelistä (valmistus liitteessä 2). Ajo suoritettiin MiniPROTEAN®-laitteella (BioRad) soveltuvassa ajopuskurissa (25 mM Tris-HCl, 200 mM glysiini, 0,1% (w/v) SDS) 80–180 V jännitteellä. Proteiinit visualisoitiin geeliltä Coomassie Brilliant Blue R-250 -värillä (45% metanoli, 10% jääetikka, 45% vesi ja 2,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250). ja tekemällä niille western blot.

Immunoblottausta tehtiin ajatulta SDS-PAGE-geeliltä siirtämällä geelillä erottuneet proteiinibändit nitroselluloosakalvolle elektroforeettisesti (Mini TransBlot®, BioRad) soveltuvalla siirtopuskurilla (25 mM Tris, 192 mM glysiini, 20% v/v metanoli, 0,037% w/v SDS). Nitroselluloosamembraanille siirtyneet proteiinibändit visualisoitiin taulukossa 1 kuvatun ohjeen mukaisesti. Detektio suoritettiin pääosin huoneenlämpötilassa.

TAULUKKO 1. Western blotin jälkeinen proteiinibändien visualisointi nitroselluloosamembraanilta

Toimenpide	Puskuri	Aika ja olosuhteet
Blokkaus	5% maito-TBS	Yön yli, +4 °C
Pesu	TBS-Tween-20 (TBTS)	3x5 min
Primäärivasta-aine	α -Avd 1:5000	1 h,
Pesu	TBS-Tween-20 (TBTS)	3x5 min
Sekundäärivasta-aine	GAR-AP 1:15 000	1 h
Pesu	TBS-Tween-20 (TBTS)	3x5 min
Tasapainotus	APA-puskuri	10 min
Värinkehitys	BCIP ja NBT APA-puskurissa	5 min

Proteiinin visualisointi nitroselluloosakalvolta aloitetaan peittämällä kalvolle vapaaksi jääneet kohdat maidon proteiineilla. Primäärivasta-aineena käytettävä polyklonaalinen kanin anti-avidini (α -Avd 1:5000 5% maito-TBST:ssä, Oulun yliopisto) tunnistaa kalvolle sitoutuneet avidiini-proteiinit spesifisesti. Sekundäärivasta-aineena käytetään vuohen anti-kani alkalinen fosfataasi-konjugaattia (GAR-AP 1:15 000 5% maito-TBST:ssä, ThermoScientific), joka sitoutuu primäärivasta-aineeseen. Kalvo pestään aina kunkin vaiheen jälkeen TBST:llä (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6, 0,05% v/v Tween-20) Väri kehitettiin kalvolle APA-puskurissa (50 mM Tris-HCl, 5 mM $MgCl_2$, pH 9,5) NBT:n (0,33 mg/ml) ja BCIP:n (0,17 mg/ml) avulla.

5.6 Proteiinikonsentraatioiden laskeminen

SDS-PAGE:lla määritetyt puhtaat proteiinifraktiot, jotka sisälsivät ainoastaan kohdeproteiinia yhdistettiin (liite 3). Yhdistettyjen proteiinifraktioiden imidatsolipitoisuutta vähennettiin dialyysillä 100 mM kautta 20 mM:ksi. Proteiinit dialysoitiin imidatsolikonsentraation alentamiseksi. Korkea imidatsolipitoisuus häiritsee absorbanssimittausta aallonpituudella 280 nm.

Dialysoinnit suoritettiin dialyysiputkella, jonka läpäisevyysraja on 12–14 kDa, eli noin viisi kertaa pienempi kuin kohdeproteiini tetrameerisessä muodossaan (~52,6 kDa) ja hieman pienempi kuin proteiinin monomeeri (~15 kDa). Läpäisevyysraja on pieni, sillä etukäteen ei voida tietää laskostuuko tutkittava proteiini oikein oligomeeriseen muotoonsa. Dialyysiliuoksen määrä on noin kolmetuhatkertainen verrattuna dialysoitavan liuoksen määrään. Proteiini-liuosten konsentraatio mitattiin NanoDrop2000 (ThermoScientific) mikrotilavuusspektrofotometrillä 280 nm aallonpituudella. Saadun absorbanssilukeman avulla lasketaan todellinen proteiinikonsentraatio.

ProtParam-ohjelma laskee useita fysikaalis-kemiallisia ominaisuuksia, jotka voidaan päätellä proteiinin sekvenssistä. Laskettavia ominaisuuksia ovat muun muassa molekyylimassa ja ekstinktiokerroin. Ekstinktiokerroin kertoo kuinka paljon valoa proteiini absorboi tietyllä aallonpituudella. Proteiinin lähes todellinen konsentraatio laskettiin Lambert-Beerin-lain mukaisesti käyttäen ekstinktiokertoa ja moolimassaa yhtälön 2 mukaan. (Switzer & Garrity 1999, 16 ja Gasteiger ym. 576–577.)

$$\text{Lambert-Beer: } A = \varepsilon c l \quad (2)$$

jossa A on absorbanssi, ε on ekstinktiokerroin, c on konsentraatio ja l on valotien pituus

$$\text{molaarinen konsentraatio} = c[M] = \frac{A_{280\text{nm}}}{\varepsilon \times l}$$

$$\text{konsentraatio} = \frac{m}{V} = c[M] \times M$$

5.7 Proteiinin oligomeerisyyden määrittäminen geelisuodatuksella

Proteiinien oligomeerisyyttä tutkittiin ÄKTApurifier™ -laitteistolla (GE Healthcare), johon oli liitetty Superdex 200 10/300 GL -kolonni (Tricorn, Amersham Biosciences, GE Healthcare). Kolonni kalibroitiin käyttäen geelisuodatuksen tarkoitettua proteiiniseosta (tyreoglobuliini, gammaglobuliini, ovalbumiini (kanan), myoglobiini ja B₁₂-vitamiini; BioRad). Molekyylistandardia käytettiin analysoitavien proteiinien molekyylipainon arvioimiseen. Eluenttina käytettiin 20mM imidatsolipuskuria, virtausnopeuden ollessa 0,5 ml/min. Analysoitavat proteiininäytteet olivat noin 50 µg, 500 µl tilavuudessa.

5.8 Differentiaaliset pyyhkäisykalorimetriakokeet

DSC-mittauksia varten proteiinien konsentraatiot säädettiin yhteneviksi (0,250 mg/ml eli noin 17 μ M) 20 mM imidatsolipuskurilla, jota käytettiin mittaukseen. Kokeisiin käytettävät ligandit laimennettiin lopulliseen pitoisuuteensa mittauspuskurilla. Käytettävät ligandit ja niiden konsentraatiot olivat: D-biotiini (Biochemica, Fluka, 14400) 50 μ M, testosteroni (Steraloids, Inc., USA) 100 μ M ja progesteroni (Steraloids, Inc., USA) 100 μ M. Kaikille liuoksille tehtiin kaasunpoisto ThermoVac[®]-laitteella (GE Healthcare, MicroCal, USA), ilmakuplien syntymisen estämiseksi. Proteiinien stabiiliuden mittaukseen käytettiin automatisoitua kapillaari-VP-DSC-laitteistoa (GE Healthcare, MicroCal, USA).

Mittauksen aikana proteiininäytteet lämmitettiin 20 °C:sta 140 °C:een, lämmitysnopeudella 120 °C/h. Lämpösiirtymän keskipisteet määritettiin MicroCal Origin[®] 7.0 -ohjelmistolla (GE Healthcare, MicroCal, USA) tehtävällä piikinsovituksella (fit). Kalorimetriset lämmönvaihdot (ΔH) jätettiin laskematta, sillä luotettavien tulosten saamiseksi proteiinikonsentraation tulisi mittauksissa olla huomattavasti korkeampi (Jelesarov & Bosshard 1999, 12 ja Määttä, fil. tri. henkilökohtainen tiedonanto 2011).

5.9 Isotermiset titrauskalorimetriakokeet

ITC-mittauksia varten proteiinien konsentraatiot yhtenäistettiin (0,300 mg/ml eli noin 20 μ M) käyttäen mittauspuskurina 20 mM imidatsolipuskuria. Ligandeina käytettiin 200 μ M loppupitoisuuteen laimennettuja D-biotiinia (Biochemica, Fluka, 14400), testosteronia (Steraloids, Inc., USA) ja progesteronia (Steraloids, Inc., USA).

Käytettävien liuosten kemiallinen koostumus pyrittiin harmonisoimaan, jottei mittaukseen tulisi tietystä komponentista häiriövaikutuksia. Koska jauheena olevien steroidien kantaliuokset (10mM) jouduttiin ensin liuottamaan 96% etanoliin, tuli lopullisen mittausliuoksen etanolipitoisuudeksi noin 2%.

Ennen mittausta liuksille tehtiin kaasunpoisto ThermoVac[®]-laitteella (GE Healthcare, MicroCal, USA). Mittaus suoritettiin VP-ITC-laitteistolla (GE Healthcare, MicroCal, USA) vakioämpötilassa +25 °C. Kontrolleina tehtiin titrauksia puskurilla puskuriin ja ligandilla puskuriin. Näillä selvitettiin pelkästä titrauksesta aiheutuvat signaalit. Mittauksia suoritettiin vielä korkeammilla proteiini- ja ligandipitoisuuksilla (100 μ M ja 1 mM) tai korkeammassa +37 °C:een lämpötilassa ja kaksinkertaisella ligandin injektioilavuudella. Tulokset laskettiin käyttäen Origin[®] 7.0 -ohjelmistoa (GE Healthcare, MicroCal, USA).

6 TULOKSET JA TULOSTEN TARKASTELU

6.1 Proteiinin tuotto ja puhdistus

Vektorin avulla transformoitiin proteiinia tuottava plasmidi BL21-AI™ *E. coli* -ekspressiosoluihin. Solut kasvoivat ampisilliinia ja tetrasykliiniä sisältävillä kasvatusmaljoilla runsaasti, mikä osoittaa solujen saaneen plasmidin sisäänsä. Jatkokasvatuksia varten saatiin valikoitua yksittäisiä bakteeripesäkkeitä. Jatkokasvatuksesta saatiin solumassaa, josta kohdeproteiini voitiin erottaa. Maljattuja pesäkkeitä ei tarkasteltu enempää, sillä työn kannalta transformaatio-
tehokkuudella ei ollut merkitystä. Tarkoituksena oli ainoastaan saada pesäke poimittua maljalta ja aloittaa uusi puhdasviljelmä, joka myöhemmin siirretään suurempaan tilavuuteen elatusainetta tuottokasvatusta varten.

Laskettaessa proteiinisaanto puhdistetuista ja dialysoiduista konstrakteista saadaan taulukon 2 (s. 57) mukainen puhdas proteiinimäärä. Proteiinimäärä voidaan laskea aiemmin esitetyn yhtälön 2 (s. 53) mukaan. Alla on esitelty esimerkikkilasku ATVN+I117Y-konstruktin konsentraation laskemiselle käyttäen ProtParam-ohjelmalla saatuja ekstinktioarvoja (ϵ) 280 nm aallonpituudella ja proteiinin molekyylimassaa. Kaikkien proteiinien lasketut arvot on koottu taulukkoon 2 (s. 57).

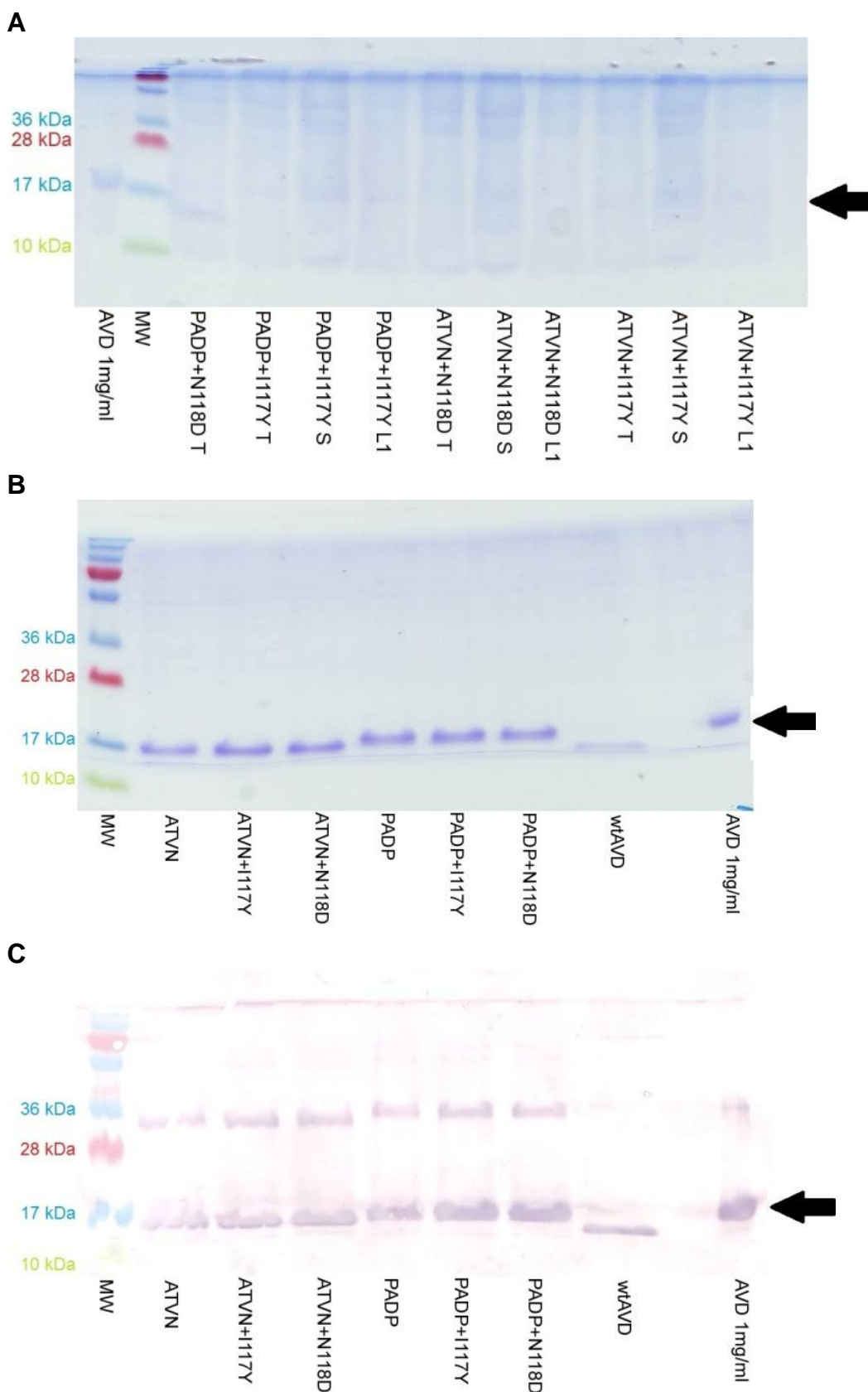
$$c[\text{M}] = \frac{0,566}{25105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \approx 2,2545 \times 10^{-5} \text{ M} \approx 22,55 \text{ } \mu\text{M}$$

$$c[\text{mg/ml}] = \frac{0,566}{25105 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 1 \text{ cm}} \times 14572,4 \text{ g/mol} \approx 0,329 \text{ mg/ml}$$

TAULUKKO 2. Puhdistetun proteiinikonstruktin saanto ja ProtParam-ohjelmalla lasketut moolimassa (M) ja ekstinktiokerroin (ϵ)

Konstrukti	A_{280}	A_{260}/A_{280}	M (g/mol)	ϵ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	c (mg/ml)	Saanto (mg/l)
ATVN+I117Y	0,566	0,63	14572,4	25105	0,329	6,6
ATVN+N118D	0,571	0,65	14523,4	23615	0,351	2,3
PADP+I117Y	0,519	0,63	14567,4	25105	0,301	6,0
PADP+N118D	1,662	0,62	14518,3	23615	1,022	4,6

Liitteessä 3 on nikkeli-sefaroosi-puhdistuksesta saatu kromatogrammi, sekä fraktioista ajetut SDS-PAGE:t. Liitteestä 3 nähdään missä vaiheessa puhdas proteiini eluoituu ja sen karakterisointi SDS-PAGE:lla ja western blotilla proteiinin varmistamiseksi. N118D-konstruktit aiheuttivat puhdistuksessa poikkeuksellisen eluutiokromatogrammin. Huonosti määritettävä elution alkamiskohta vaikeutti proteiinin sijainnin määrittämistä fraktioista, mistä syystä SDS-PAGE:lla analysoitiin useampi fraktio proteiinin löytämiseksi. Proteiinien dialyysin jälkeen ajettiin lopullisen puhtauden määrittämiseksi SDS-PAGE, joka värjättiin Coomassie Blue:lla tai sille tehtiin western blot (kuva 10, B tai C, s. 58). Kuvaan 10 A (s. 58) on koottu prosessin eri vaiheissa otetut SDS-PAGE-näytteet.



KUVA 10. (A) Homogenisoitu proteiininäyte (T) ja sentrifugoimalla erotetut liuosnäyte (L1) ja resuspensoitu sakkanäyte (S). (B) Dialyysin jälkeinen SDS-PAGE ja (C) western blot proteiininäytteistä konsentraatiossa 0,15 mg/ml. Kuviin on merkitty kokostandardin (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder #SM1811, Fermentas) bändit 36–10 kDa.

Todellisuudessa proteiinin määrä on vielä hieman korkeampi puhdistettuun proteiinimäärään verrattuna (taulukko 2, saanto, s. 57), sillä dialyysiin ei valittu jokaista fraktiota, jossa proteiinia näyttäisi olevan. Homogenisoidusta proteiini-näytteestä ajetut geelit kertovat ettei sakkanäytteeseen (S) juurikaan jäänyt kohdeproteiinia (kuva 10, A, s. 58). Valituksi tulivat ainoastaan kahdeksan proteiinkonsentraatioltaan suurinta fraktiota SDS-PAGE-määritysten perusteella (liite 3). Fraktioista suurimmat määritettiin silmämääräisesti vertailemalla bändien intensiteettiä geelillä.

Kaikille konstruktelle saatiin yhteensä kahden litran pullotuotoista kasvatusolosuhteisiin nähden hyvät tuotot. Proteiinin määrä vaihteli eri konstruktien välillä, erityisesti huomioitava oli N118D-konstruktit, joiden tuotto oli selvästi I117Y-konstrukteja alhaisempaa (taulukko 2, saanto, s. 57). Tästä syystä loppukokeita varten N118D-konstrukteja jouduttiin konsentroimaan Amicon® Ultra-15 10k -sentrifugointifilttereillä (Millipore).

Verrattaessa Hytönen ym. (2004) suorittamiin proteiinituottoihin villityypin avidiinilla (10 mg/l) ovat pullokasvatuksilla saadut proteiinituotot hieman alhaisempia. Kaupallisen HisTrap FF crude 5 ml -nikkeli-sefaroosi-affiniteettipylvään (GE Healthcare) puhdistuskapasiteetti oli korkea, sillä yksi kahden litran proteiinituotto pystyttiin sitouttamaan pylvääseen yhdellä kertaa. Proteiinin eluutio nikkeli-sefaroosi-pylväästä oli vaivatonta ja fraktioiden perusteella täydellistä (liite 3), sillä proteiinia ei enää ollut loppupään fraktioissa. Helppo eluutio edistää proteiinin aktiivisuuden säilymistä, sillä proteiini ei altistu haitallisille puskureille (HisTrap Affinity Columns 2009, 8).

ATVN+N118D-konstrukti tuottui selvästi muita alhaisemmin. Verrattaessa toista N118D-konstruktia muihin, eivät niiden väliset erot ole yhtä huomattavia (taulukko 2, s. 57). Kuitenkin kaikki proteiinit eluoituivat pylväästä ja puhdistettiin onnistuneesti, mistä kertoo alhainen absorbanssisuhde A_{260}/A_{280} . Suhde olisi korkeampi, esimerkiksi, jos näytteet sisältäisivät DNA:ta tai RNA:ta. Yleisesti voidaan sanoa, mitä alhaisempi A_{260}/A_{280} -suhde, sitä puhtaampi proteiini.

Suhteen ollessa alle 0,7 voidaan proteiinin sanoa olevan jo riittävän puhdasta jatkomäärityksiin. Absorbanssisuhde riippuu kuitenkin proteiinin aminohapposekvenssistä, joten se on kullekin proteiinille ominainen. (Held 2008, 9–11.)

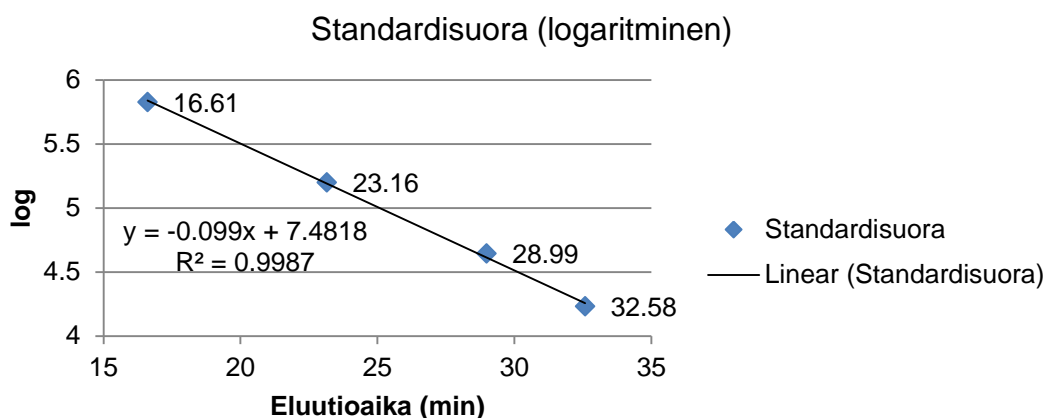
Aiemmin Hytönen ym. (2004, 389) ovat osoittaneet että mahdollista tuottaa aktiivista ja liukoisessa muodossa olevaa kanan avidiinia *E. coli*:n periplasmaan. Tuotetun ja puhdistetun OmpA-signaalisen avidiinin aktiviteetti biotiinia kohtaan on korkea, eli lähes kaikki sen biotiinin sitomispaikat ovat tyhjiä. (Hytönen ym. 2004, 389.) Proteiinimutanttien kohdalla todettiin liukoisen proteiinin tuoton olevan mahdollista *E. coli*:ssa. Mutanttiproteiinit eivät sakkautuneet kriittisissäkään puhdistusvaiheissa, joten niiden aktiivisuutta voitiin lähteä tutkimaan.

Dialyysin jälkeen ajetuista SDS-PAGE-geeleistä voidaan arvioida proteiinin lopullista puhtautta (kuva 10, B ja C, s. 58). Kuvasta 10 (s. 58) nähdään proteiinin olevan loppumäärityksiä varten varsin puhdas ja kokostandardin avulla määritettynä kooltaan alle 17 kDa. Kuten ProtParam-ohjelman mukaan, mutanttiproteiinien koko on geeliltä arvioitaessa suunnilleen 14 kDa (merkitty nuolella). Western blot -määritys todistaa proteiinin todella olevan avidiinia. Kuvassa 10 C (s. 58) näkyvät ylemmät bändit johtuvat todennäköisimmin avidiinin puutteellisesta denaturaatiosta ja ovat todennäköisimmin avidiini-dimeerejä (koko yli 28 kDa, mutta alle 36 kDa).

6.2 Geelisuodatustulokset

Geelisuodatuksen avulla pyrittiin selvittämään proteiinin kvaternääristä rakennetta. Eritoten kiinnostavaa oli, oliko proteiini säilyttänyt tetrameerisen rakenteensa tuoton ja puhdistuksen aikana. Lisäksi tutkittiin proteiinin eluutiokuvaajaa. Eluoituiko proteiini yhtenä terävänä piikkinä vai syntyikö eluutiopiikkejä useampi? Koska geelisuodatus menetelmänä ei ole absoluuttisen tarkkaa, proteiinin tetrameerisyyden toteamiseksi sallitaan noin 10 kDa heitto teoreettisesta tetrameerisestä molekyylikoosta 52,6 kDa (Hytönen ym. 2004, 388 ja Määttä, fil. tri, henkilökohtainen tiedonanto 2011).

Kuvioon 9 on piirretty standardisuora geelisuodatusstandardin (BioRad) komponenttien eluutioajan ja molekyylikoon logaritmin mukaan. Taulukosta 3 (s. 62) nähdään standardisuoran eri komponenttien erottuminen toisistaan. Taulukkoon 4 (s. 62) on koottu proteiininäytteiden eluutioajat ja standardisuoran avulla määritetyt molekyylikoot. Kuviossa 10 (s. 63) esitetään eluutiokuvaajat proteiineille wtAvd ja PADP sekä sen pistemutanteille I117Y ja N118D.



KUVIO 9. Standardisuora piirrettynä geelisuodatusstandardin logaritmeista, missä eluutioaika on otettu taulukosta 3 (s. 62). Kuviossa on mukana suoran kulmakerroin ja piirtämiseen käytetyt x-akselin arvot.

Logaritminen sovitus saadaan laskemalla standardisuoran (kuvio 9, s. 61) yhtälöstä ($y = -0,099 \times x + 7,4818$) käyttämällä eluutioaikaa taulukosta 4 arvona x ja molekyyl koko saadaan logaritmikaavasta. Esimerkiksi villityypin avidiinille sen eluutioajan ollessa 28,4 min:

$$y = -0,099 \times 28,4 + 7,4818 = 4,6702$$

$$y = \log_a x \leftrightarrow x = a^y$$

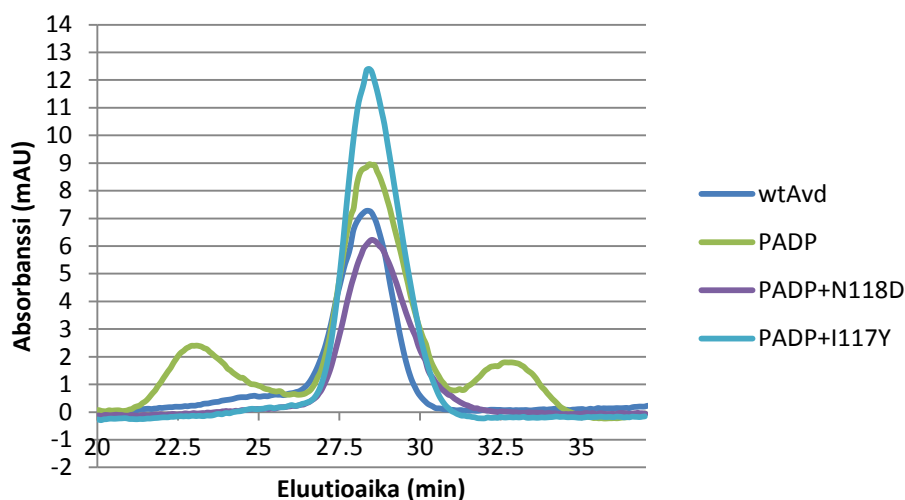
$$x = 10^{4,6702} \approx 46795,06$$

TAULUKKO 3. Geelisuodatusstandardin koostumus ja eluutioajat

Nimi	Molekyyl koko (Da)	log	Eluutioaika (min)	Eluutiotilavuus (ml)
tyreoglobuliini	670 000	5,826075	16,61	8,305
gammaglobuliini	158 000	5,198657	23,16	11,579
ovalbumiini	44 000	4,643453	28,99	14,493
myoglobiini	17 000	4,230449	32,58	16,290
B ₁₂ -vitamiini	1 350	3,130334	39,85	19,923

TAULUKKO 4. Proteiineille määritetyt molekyyl kokoot ja eluutioajat

Proteiini	Eluutioaika (min)	logaritminen sovitus	Molekyyl koko (kDa)
wtAvd	28,400	4,6702	46,8
ATVN	29,538	4,557538	36,1
ATVN+I117Y	ei pystytty määrittämään piikkiä		
ATVN+N118D	ei pystytty määrittämään piikkiä		
PADP	28,428	4,667428	46,5
PADP+I117Y	28,420	4,66822	46,6
PADP+N118D	28,488	4,661488	45,9



KUVIO 10. Eluutiopiikit proteiineille wtAvd, PADP ja sen pistemutantit. Proteiinit eluutuvat terävinä piikkeinä. PADP tuotti kromatogrammiin kolme piikkiä.

Geelisuodatusstandardin (Biorad) avulla määritettiin proteiinien koolle standardisuora, johon piirrettiin x-akselille eluutioaika minuutteina ja y-akselille logaritmi proteiinin koosta kilodaltonneina. Eluutioaika määritettiin ottamalla arvo (min) kuvaajaan syntyneen piikin korkeimmasta kohtaa. Suoralle saatiin paras sovitus (R^2) jättämällä pienin standardi, B₁₂-vitamiini (1350 kDa), standardisuoran ulkopuolelle (kuvio 9, s. 61 ja taulukko 3, s. 62). Sovittamalla haluttujen proteiinien eluutioaika suoralle, saadaan tietoon niiden molekyylikoko (taulukko 4, s. 63). Vertailuarvona toimii Hytönen ym. (2004) tutkimus, jossa villityypin avidiinin molekyylikooksi saatiin geelisuodatuksen avulla 52,6 kDa. Lisäksi Riihimäki ym. (2011, 10) havaitsivat ATVN-proteiinin eluoituvan tetrameerisenä.

WtAvd:n ja PADP-mutanttien eluutiopiikit olivat kaikki malliltaan hyviä ja erottuivat selkeästi eluutiokuvaajalta. ATVN-mutanttien piikeistä on vaikeampi selvittää proteiinin eluutioaika, eikä ATVN:n pistemutanteille sitä kyetty määrittämään (taulukko 4, s. 62). Kuvio 10 nähdään proteiinien eluution olleen terävää. Ainoastaan PADP saattaa olla laskoksiltaan purkautunut, päätellen eluutiokuvaajaan syntyneistä muista piikeistä (Määttä, fil. tri. henkilökohtainen tiedonanto 2011). Laskettaessa molekyyli­massat PADP:tä reunustaville piikeille saadaan tuloksiksi noin 157,4 kDa ja 17,7 kDa. On

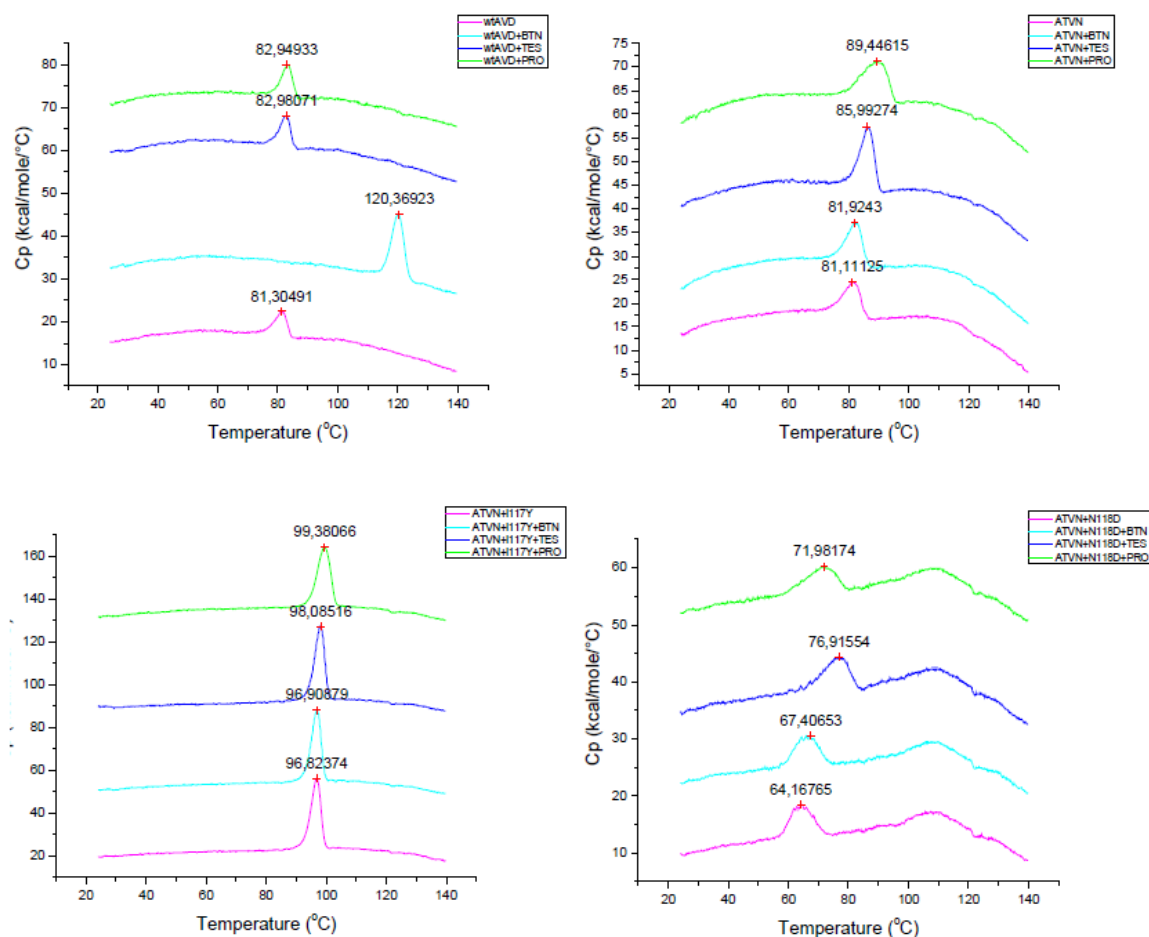
mahdollista, että myöhemmin (noin 33 min) eluoituva piikki saattaisi olla monomeereiksi hajonnutta PADP-proteiinia. Aiemmin eluoituvan (noin 23 min) suuremman piikin aiheuttajaa ei tunnistettu.

Kaikkiaan proteiinien geelisuodatuksella saatujen tulosten perusteella huomataan, että saatu tulos on teoreettista tetrameerisen proteiinin kokoa (52,6 kDa wtAvd:lla) pienempi (taulukko 4, s. 62). Ottaen huomioon geelisuodatus-tekniikan tarkkuuden (± 10 kDa), voidaan proteiinien PADP ja sen mutanttien, sekä ATVN:n, sanoa säilyneen tetrameerisessä muodossaan. Ero wtAvd:in teoreettiseen tetrameeriseen molekyyl kokoon on vähäinen. Proteiinin tetrameerisyyden säilyttäminen on avainasemassa tutkittaessa sen ligandinsitomiskykyä ja stabiiliteettia. Tetrameerisessä muodossaan proteiini toimii parhaiten. (Green & Toms 1973, 698.) Geelisuodatuksella määritetyt molekyylit eivät todellisuudessa ole mahdollisia. On epätodennäköistä, että proteiinista olisi poistunut yksi monomeeri, mikä vastaisi saatuja kokoja (taulukko 4, s. 62). (Määttä, fil. tri. henkilökohtainen tiedonanto 2011.)

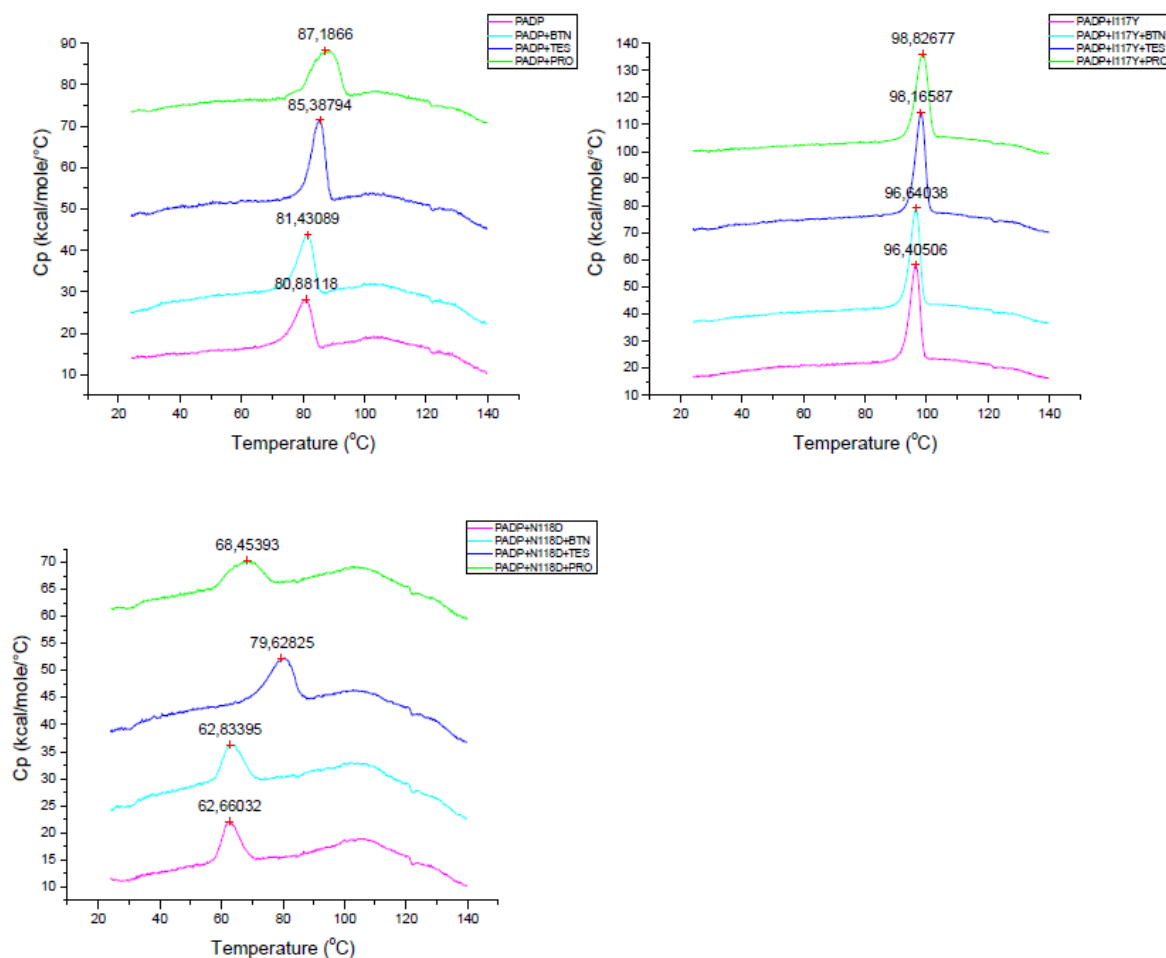
Selkeämmän proteiinien eluution aikaansaamiseksi tulisi proteiinien konsentraatiota liuoksessa kasvattaa. Tällöin olisi todennäköisesti mahdollista havaita ATVN-mutanttien eluutiopiikit. Eluution selventämiseksi pylvään läpi voitaisiin ajaa vielä kymmenkertainen proteiinimäärä käytettyyn verrattuna. Myös puskurin vaihtoa voitaisiin kokeilla, sillä 20 mM imidatsolipuskuri aiheutti eluutiokuvaajan loppuun runsaasti häiriöitä. Proteiinimäärä pidettiin pienenä sillä oligomeerisyyttä tutkittiin ennen proteiinien konsentroidintia ja proteiinien konsentraatiot geelisuodatusta varten yhtenäistettiin pienimmän mukaan. Tämän lisäksi proteiinia ei otettu talteen.

6.3 Pyyhkäisykalorimetriatulokset

Pyyhkäisykalorimetriakokeissa pyrittiin selvittämään eri ligandien aikaansaama lämpöstabiiliteetin muutos tutkittavissa proteiineissa. Lämpöstabiilius mitattiin kaikkiaan kolmen eri ligandin läsnä ollessa sekä ilman ligandia. Alla kuviossa 11 (jatkuu sivulle 66) on esitetty Origin 7.0[®] -ohjelmalla (GE Healthcare, MicroCal, USA) analysoidut lämpövirtauspiikit kullekin mitatulle proteiini ja ligandi yhdistelmälle. Kuvioon on etsitty ohjelman avulla piikin korkein kohta, joka kuvaa lämpöstabiiliusarvoa (T_m). Origin 7.0[®] -ohjelmalla (GE Healthcare, MicroCal, USA) tehdyillä piikinsovitusarvoilla lasketut lämpöstabiiliusarvot ovat koottuna taulukkoon 5 (s. 67).



(jatkuu)



KUVIO 11. Lämpösiirtymäkuvaajat DSC-mittauksista proteiineille ja niiden ligandeille. Ligandilisäykset näkyvät pienessä laatikossa vaihtelevin värikoodein järjestyksessä ylhäältä alas: ilman ligandia, biotiini, testosteroni ja progesteroni. Proteiinit vasemmalta oikealle: wtAvd, ATVN, ATVN+I117Y, ATVN+N118D, PADP, PADP+I117Y ja PADP+N118D. Kuvaajiin on etsitty lämpötilapiikit kuvaajan korkeimmasta kohtaa Origin 7.0[®] -ohjelmalla (GE Healthcare, MicroCal, USA).

TAULUKKO 5. Lämpösiirtymät (T_m) mitatuille proteiineille 17,24 μM (0,250 mg/ml) konsentraatiossa. Lämpösiirtymätilan muutosta on verrattu wtAvd-kontrolliin, sekä villityypin proteiineihin, että proteiiniin ilman ligandia.

Näytteen kuvaus	c(ligandi) [μM]	T_m [$^{\circ}\text{C}$]	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$] vrt. wtAVD	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$] vrt. ATVN/PADP	ΔT_m [$^{\circ}\text{C}$] vrt. ilman ligandia
wtAVD	0	80,94 \pm 0,05	0,00		0,00
wtAVD+BTN	50	119,9 \pm 0,02	38,96		38,96
wtAVD+TES	100	82,35 \pm 0,05	1,41		1,41
wtAVD+PRO	100	82,93 \pm 0,04	1,99		1,99
ATVN	0	81,00 \pm 0,04	0,06	0,00	0,00
ATVN+BTN	50	81,69 \pm 0,04	0,75	0,69	0,069
ATVN+TES	100	85,89 \pm 0,04	4,95	4,89	4,89
ATVN+PRO	100	88,53 \pm 0,07	7,59	7,53	7,53
ATVN+I117Y	0	96,52 \pm 0,02	15,58	15,52	0,00
ATVN+I117Y+BTN	50	96,62 \pm 0,02	15,68	15,62	0,10
ATVN+I117Y+TES	100	97,75 \pm 0,02	16,81	16,75	1,23
ATVN+I117Y+PRO	100	99,20 \pm 0,02	18,26	18,20	2,68
ATVN+N118D	0	64,31 \pm 0,05	-16,63	-16,69	0,00
ATVN+N118D+BTN	50	65,93 \pm 0,06	-15,01	-15,07	1,62
ATVN+N118D+TES	100	75,87 \pm 0,07	-5,07	-5,13	11,56
ATVN+N118D+PRO	100	70,73 \pm 0,07	-10,21	-10,27	6,42
PADP	0	79,85 \pm 0,05	-1,09	0,00	0,00
PADP+BTN	50	80,74 \pm 0,04	-0,20	0,89	0,89
PADP+TES	100	84,78 \pm 0,03	3,84	4,93	4,93
PADP+PRO	100	87,01 \pm 0,06	6,06	7,15	7,15
PADP+I117Y	0	96,12 \pm 0,02	15,18	16,27	0,00
PADP+I117Y+BTN	50	96,21 \pm 0,01	15,27	16,36	0,09
PADP+I117Y+TES	100	97,92 \pm 0,02	16,98	18,07	1,80
PADP+I117Y+PRO	100	98,46 \pm 0,02	17,52	18,61	2,34
PADP+N118D	0	62,99 \pm 0,03	-17,95	-16,86	0,00
PADP+N118D+BTN	50	63,53 \pm 0,05	-17,41	-16,32	0,54
PADP+N118D+TES	100	79,31 \pm 0,05	-1,63	-0,54	16,32
PADP+N118D+PRO	100	67,52 \pm 0,07	-13,42	-12,33	4,53

Wei ja Wright tutkivat avidiinin lämpöstabiiliutta kalorimetrisesti vuonna 1964 (341). Tuolloin he havaitsivat avidiini-proteiinin epätavallisen korkean lämpöstabiiliuden. Myös Donovan ja Ross (1973, 514) ovat tutkineet avidiini-biotiini-kompleksin lämpöstabiiliutta ja määrittäneet avidiinille siirtymälämpötilan 85 $^{\circ}\text{C}$ sekä avidiini-biotiini-kompleksille 132 $^{\circ}\text{C}$. González, Argaraña ja Fidelion (1999, 70) mukaan kuitenkin Donovanin ja Rossin käyttämä korkea lämmitysnopeus saattaa siirtää kompleksin lämpösiirtymää oikeaa korkeammaksi ja heidän määrittämänsä lämpösiirtymät lämmitysnopeudella 55,6 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ ovat avidiinille 83,8 $^{\circ}\text{C}$ ja avidiini-biotiini-kompleksille 117 $^{\circ}\text{C}$. González ym. (1999, 70) tulokset

ovat yhteneviä nyt määritettyihin taulukossa 5 (s. 67) esitettyihin tuloksiin verrattaessa villityypin avidiinin siirtymälämpötilaan 80,94 °C ja wtAvd-biotiini-kompleksin 119,9 °C:een.

Taulukosta 5 (s.67) nähdään wtAvd:n erittäin korkea lämpöstabiilius, mikä on aikaisemmissa tutkimuksissa huomattu. Voidaankin uskoa tulosten olevan kontrollin perusteella luotettavia verrattaessa edellä esitettyihin muihin tutkimustuloksiin. Origin[®] 7.0 -ohjelman (GE Healthcare, MicroCal, USA) antama virhemarginaali sovitetuille T_m -arvoille on hyvin pieni, noin 0,1%. Toisaalta esimerkiksi pipettien tarkkuuteen ei kohdistettu huomiota.

Riihimäki ym. (2011, 5) ovat aikaisemmin tutkineet ATVN-mutantnin lämpöstabiiliutta biotiinin ja testosteronin kanssa. Lämpösiirtymiksi he ovat saaneet ilman ligandia 82,5 °C, biotiinin kanssa 83,0 °C ja testosteronin kanssa vain 83,1 °C. Taulukkoon 5 (s. 67) kootut tulokset ovat lähellä heidän määrittämiä lämpösiirtymiä. Kuitenkin testosteronin todettiin stabiloivan proteiinia huomattavasti, lähes 5 °C (taulukko 5, ATVN+TES, s. 67) verrattuna aikaisempaan Riihimäki ym. (2011, 5) havaitsemaan vähäiseen lämpöstabiiliuden nousuun (0,5 °C).

Riihimäki ym. (2011) tutkimus on suoritettu samassa tutkimusryhmässä, missä opinnäytetyökin suoritettiin. Tästä johtuen voidaan muutamia asioita nyt havaittuun testosteronin tuottamaan lämpöstabiiliuden nousuun pohtia. Laitteet ja käytetyt tekniikat vastaavat lähes täysin toisiaan kummassakin tutkimuksessa. Todennäköisin syy havaittuun huomattavaan nousuun ATVN:n lämpöstabiiliudessa testosteronin kanssa on steroidien säilyvyyteen ja säilytykseen kohdistettu huomio. Aikaisemmin tehdyissä kokeissa on ollut mahdollista että käytetty steroidiliuos on vanhennut ennen sen käyttöä. Nyt käytetyt steroidiliuokset valmistettiin juuri ennen mittauksia.

Pistemutantti I117Y:n havaittiin toimivan täysin oletusten mukaisesti. Pistemutaatio I117Y lisää proteiinin stabiiliutta huomattavasti, jopa yli 18 °C, siirtäen lämpösiirtymän 96 °C:een (taulukko 5, s.67). Lisäämällä ligandin sitomiseen kriittisiä tyrosiinitähteitä saadaan proteiinin lämpöstabiiliteettia nostettua. Kuitenkaan ligandin sitoutumisella ei näyttäisi olevan juurikaan vaikutusta proteiinin stabiiliteettiin. Toisaalta stabiiliteetti on jo valmiiksi korkea ilman ligandia, yli 96 °C (taulukko 5, ATVN+I117Y ja PADP+I117Y, s. 67).

Toisesta pistemutantista N118D huomattiin testosteronin voimakkein stabiloiva vaikutus: lämpösiirtymä nousee yli 10 °C. Onkin todennäköistä, kun verrataan testosteronin ja progesteronin stabiloivaa vaikutusta (taulukko 5, s.67), että N118D-mutantti suosisi testosteronin sitoutumista ligandinsitoutumispaikkaansa. N118D-pistemutantti näyttäisi toimineen siis oletusten mukaisesti.

Kääntöpuolena lisääntyneelle ligandispesifisyydelle N118D-mutanttin lämpöstabiilius näyttää heikenneen selvästi proteiinista ilman pistemutaatiota. N118-aminohappotähteen tiedetään toimivan ligandinsitomisen kannalta kriittisenä tekijänä. Muokkaamalla N118-aminohappotähte asparagiinihapoksi huomattiin proteiinin stabiiliuden heikentyvän jo ilman ligandia (taulukko 5, s. 67). Vaikuttaisi siis siltä, että asparagiinilla on myös itse proteiinia stabiloivia vaikutuksia.

Mutanttiproteiineista huomattiin Riihimäki ym. (2011, 4) tapaan progesteronin aikaansaama korkein stabiiliteetti muissa mitatuissa proteiineissa kuin N118D-mutanteissa. Progesteronin havaittiin stabiloivan proteiinia korkeimmillaan 7,5 °C (taulukko 5, ATVN+PRO, s. 67). Kuitenkaan aikaan ei saatu yhtä huomattavaa stabiloitumista kuin kontrollina käytetyssä wtAvd-biotiini-kompleksissa.

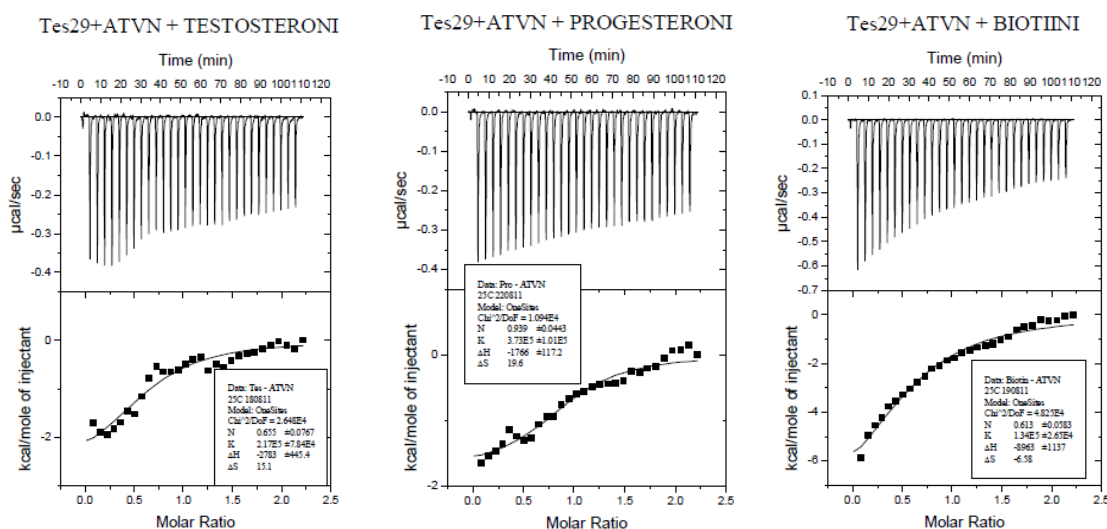
Erityisesti kiinnostavaa kaikista proteiinimutanteista oli huomata, kuinka biotiini ei enää vaikuttanut niihin stabiloivasti (taulukko 5, s. 67). Biotiinin vähäisestä vaikutuksesta proteiinin stabiloitumiseen voidaankin päätellä affiniteetin biotiinia kohtaan vähentyneen mutaatioiden myötä. Oletettavasti biotiinin sitoutumiseen tärkeiden S16:n, T35:n ja T38:n aminohappojen muokkaus vähensi affiniteettia biotiinille (kuva 9, s. 46). DSC-kokeiden perusteella voidaan proteiinien uskoa sitovan testosteronia ja progesteronia, sillä niiden lisäys vaikutti proteiinin lämpöstabiiliuteen (taulukko 5, s. 67). Tuloksien varmentamiseksi tulisivat mittaukset vielä toistaa.

Kuviossa 11 (s. 65–66) on nähtävissä kustakin proteiinista piirretyt lämpösiirtymäkuvaajat, joissa nähdään muodostuvan T_m -piikin siirtymä. Siirtymiä nähdään pääosin vain yksi, mikä kertoo niin proteiinin puhtaudesta kuin ligandi-proteiini-kompleksin täydellisestä muodostumisestakin. N118D-mutantilla piikkejä näennäisesti erottuisi kaksi kappaletta, mistä voitaisiin todeta proteiinilla olevan kaksi siirtymälämpötilaa, eli proteiinista olisi liuoksessa kaksi muotoa. Voitaisiin ajatella proteiinin ensin denaturoituvan alayksiköiden irtoutuessa toisistaan, minkä jälkeen tapahtuisi lopullinen denaturaatio. (Määttä, fil. tri. henkilökohtainen tiedonanto 2011.)

Toisaalta on mahdollista, että ligandin sitoutumispaikat eivät olisikaan täysin saturoituneet, vaan mitattuun liuokseen olisi jäänyt kompleksoitumatonta proteiinia. Tällöin saataisiin kaksi lämpösiirtymäpiikkiä, joissa toisessa näkyisi pelkästään proteiinin ja toisessa kompleksin lämpösiirtymät. On kuitenkin todennäköisempää, että muodostunut toinen piikki johtuu vain pohjaviivan analysointitavasta, eli se ei todellisuudessa ole huomion arvoinen. Täten ainoa merkittävä lämpösiirtymä N118D-pistemutanteilla on selkeiden havaittu piikki 60 °C:een jälkeen. (Määttä, fil. tri. henkilökohtainen tiedonanto 2011.)

6.4 Titrauskalorimetriatulokset

ITC:n avulla määritettyjä sitoutumisvakioita aidiinin steroideja sitoville mutanteille ei onnistuttu luotettavasti määrittämään. Tulosten epäluotettavuuden vuoksi kaikkia proteiini-ligandi-yhdistelmiä ei lopulta mitattu. ITC-titrauskuvaajat löytyvät kokonaisuudessaan liitteestä 5. Kuviossa 12 esitetään ITC:n avulla määritetyt luotettavimmiksi arvioidut titraussignaali ATVN-proteiinille (Hytönen, fil. tri. ja Määttä, fil. tri henkilökohtainen tiedonanto 2011). Tulokset ovat koottuna taulukkoon 6, jossa on sitoutumisen stoikiometrinen arvo (n), sitoutumisvakio (K), entalpiamuutos (ΔH) ja entropian muutos (ΔS). Sitoutumisvakion avulla voidaan määrittää dissosiaatiovakio (K_d) yhtälön 1 mukaan (s. 42).



KUVIO 12. Titraussignaali ATVN-mutanttiin eri ligandeilla ja niistä piirretyt sitoutumiskuvaajat. Saturaatiota ei saavuteta missään kokeista. ATVN antaa kaikille ligandeille vähäisen signaalin. Biotiinille on havaittavissa steroideja suurempaa affiniteettia.

TAULUKKO 6. ITC-mittauksista 25 °C:ssa kerätty data ATVN-proteiinille 20 mM imidatsolipuskurissa, jossa 2% etanolia. Käytetyt konsentraatiot olivat proteiineille 20 µM ja ligandeille 200 µM.

Tes29+ATVN (20µM) 25°C					
Ligandi (200µM)	n	K_B (M ⁻¹)	K_d (M)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (eu)
Testosteroni	0,655	$2,17 \cdot 10^5$	$4,61 \cdot 10^{-6}$	$-2,783 \cdot 10^3$	15,1
Progesteroni	0,939	$3,73 \cdot 10^5$	$2,68 \cdot 10^{-6}$	$-1,766 \cdot 10^3$	19,6
Biotiini	0,613	$1,34 \cdot 10^5$	$7,46 \cdot 10^{-6}$	$-8,963 \cdot 10^3$	-6,58

Ainoallakaan ligandilla ei saatu saturaatiota aikaan kohdeproteiinissa, joten tulokset ainoastaan suuntaa-antavia (kuvio 12, s. 71 ja liite 4). Origin® 7.0 -ohjelmalla (GE Healthcare, MicroCal, USA) pystyttiin kuitenkin tulkitsemaan tulokset vähentämällä viimeinen piikki kaikista piikeistä. Tällöin ohjelma olettaa saturaation tapahtuneen viimeisimmän titrauspiikin kohdalla.

Taulukkoon 6 (s. 71) on kerätty ainoastaan titrauskuvaajien ja stoikiometristen arvojen perusteella lähes luotettaviksi luokitellut tulokset. Muut tulokset ovat kuvaajiensa osalta nähtävissä liitteessä 4. Tuloksista on selvästi nähtävissä alentunut affiniteetti biotiinia kohti (taulukko 6, s. 71 ja liite 4). Mikäli biotiinin todellinen affiniteetti olisi proteiinissa säilynyt, olisi saturaation pitänyt tapahtua kokeen aikana. Saturaatio nähdään kontrollina määritetyssä avidiini-biotiini-titrauksessa (kuvio 7, s. 41). Avidiinin todellinen affiniteetti biotiinia kohtaan on kuitenkin mitattua korkeampi ja laitteen mittausalueen ulkopuolella. Tästä syystä ainoat luotettavat mitatut arvot ovat entalpian muutos (ΔH) ja stoikiometria (n) (kuvio 7, s. 41).

Katsottaessa liitteestä 4 reaktioiden stoikiometrisia arvoja (n) nähdään jossain kokeissa arvojen olevan mahdottomia (Tes29+PAPD, testosteronille 17,6). Ideaalitilanteessa arvo olisi lähellä yhtä, tällöin kaikki proteiinien ligandinsitomispaikat olisivat vielä aktiivisia (Määttä, fil. tri. henkilökohtainen tiedonanto 2011). Avidiinilla on ainoastaan yksi ligandinsitomispaikka monomeerissa, eli yhteensä neljä paikkaa tetrameerissä. Ligandinsitomispaikkojen säilynyt aktiivisuus kertoo tuoton ja puhdistuksen olosuhteiden olleen vapaa ligandeista.

Aiemmin Riihimäki ym. (2011, 5) ovat osoittaneet avidiinin Tes29- ($K_d \sim 9 \mu\text{M}$) ja ATVN-mutanttien ($K_d \sim 11 \mu\text{M}$) sitovan testosteronia mikromolaarisella affiniteetilla. Kyseistä tulosta ei tässä työssä pystytty toistamaan ITC:n avulla, eikä uusille pistemutanteille saatu luotettavia affiniteettiarvoja steroideja tai biotiinia kohtaan. Taulukkoon 6 (s. 71) lasketut dissosiaatiovakiot näyttävät osaltaan olevan lähellä oletettua mikromolaarista luokkaa ja laskentaohjelman avulla tehdyt korjaukset titrauspiikkeihin näyttäisivät antavan oikeansuuntaisia

tuloksia. Kuitenkin liitteen 4 kuvaajia katsottaessa huomataan, ettei lupaavia sitoutumiskuvaajia tulosten perusteella saatu piirrettyä kuin proteiinista ATVN (kuvio 12, s. 71). Pisteet ovat liian hajallaan sitoutumisaffiniteetin määrittelyyn. Lämpötilan nostolla ei havaittu olevan vaikutusta ligandin sitoutumiseen (liite 4, ATVN+N118D+TES).

Titrauskuvaajista (liite 4) näkyy selvästi, ettei minkään ligandin sitoutuminen kohdeproteiiniin ollut tiukkaa. Ligandin lisäyksestä muodostuva signaali on hyvin alhainen. Riihimäki ym. (2011, 5) ovat myös todenneet biotiinin sitoutumisaffiniteetin heikentyneen ATVN-mutantilla. Affiniteetti avidiini-mutantilla Tes29+ATVN biotiinia kohti on selvästi alentunut verrattaessa teoreettiseen femtomolaariseen dissosiaatiovakioon. Edelleen affiniteetti biotiinia kohti on alentunut pistemutaatioita tehtäessä. Erityisesti biotin sitomiseen tärkeän N118-tähteen muokkaaminen vaikutti biotiinin sitomiseen selvästi: saatu signaali biotiinin sitoutumisesta on enää noin 10% verrattuna signaaliin, joka mitattiin villityyppiselle proteiinille.

ITC-mittauksista voidaan todeta, etteivät ne sovellu ainakaan käytetyissä olosuhteissa mittaamaan kohdeproteiinien affiniteettia käytetyille steroideille. Oletuksena kuitenkin kokeita tehtäessä oli, että kymmenkertainen ligandimäärä riittäisi saturoimaan proteiinin ligandinsitomispaikat, kuten tapahtui avidiini-biotiini-kontrollille (kuvio 7, s. 41). On mahdollista, että käytetty proteiini- ja ligandimäärä ei riittänyt sitoutumisen havaitsemiseen.

Tulevaisuudessa tulisi proteiinin ja ligandin konsentraatioita kasvattaa, mikäli tutkittaisiin käytettyjen proteiinien affiniteettia isotermissellä titrauskalorimetrialla. Toisaalta ligandiliuoksen konsentraatiota steroidien osalta ei voida loputtomasti lisätä, sillä ligandin liukoisuus puskuriin muodostuu esteeksi. On mahdollista, että vaihtamalla puskuria päästäisiin erilaisiin tuloksiin. Kasvattamalla injektio-tilavuutta saataisiin synnytettyä reaktiossa enemmän läpötilaa, mikä saattaisi auttaa tuloksien havaitsemista.

7 PÄÄTÄNTÖ

Tutkimuksen tavoitteena oli tuottaa uutta tietoa aidiinin steroideja sitovien mutanttien pistemutaatioiden vaikutuksesta proteiinin tuottumiseen, stabiiliuteen ja sitomisspesifiteettiin. Hypoteesina oletettiin pistemutaation I117Y sekä parantavan proteiinin tuottoa, että stabiiloivan proteiinin kvaternääristä rakennetta. Tulokset osoittivat hypoteesien käyneen toteen molemmilta osiltaan. Proteiinin tuotto oli I117Y-pistemutantilla selkeästi korkeampaa kuin toisella N118D-mutantilla. I117Y-mutaatio vaikutti olennaisesti proteiinin stabiiliuteen nostamalla lämpösiirtymätilaa jopa 18 °C.

N118D-pistemutantin lämpöstabiiliteetti heikkeni selvästi, mutta sitoutuminen DSC-kokeiden perusteella saattaisi suosia testosteronia progesteronin sijaan. Proteiinin tuottuminen N118D-pistemutantilla oli lähes 100% heikompaa kuin I117Y-pistemutantilla. Kuitenkin molempia proteiinimutanteja saatiin tuotettua riittävä määrä niiden toiminnan tutkimista varten. Koska ITC-kokeista ei konkreettisia ja luotettavia tuloksia saatu aikaan, ei proteiinien todellisia sitoutumisaffiniteetteja saatu määritettyä. Affiniteetti voitaisiin kenties selvittää jollakin muulla menetelmällä tai vaihtamalla mittaukseen käytettyjä olosuhteita.

Mielenkiintoinen jatkotutkimus olisi molempien pistemutaatioiden liittäminen samaan konstruktiin. Toimisivatko pistemutaatiot I117Y ja N118D yhdessä muodostaen stabiilimman testosteronia suosivan proteiinin? Tulevaisuudessa steroideja sitovia proteiineja voitaisiin esimerkiksi käyttää vasta-aineiden tavoin seulomaan ligandejaan seoksesta. Koska tutkitut proteiinit ovat stabiilimpia kuin vasta-aineet, voitaisiin niitä käyttää vasta-aineille sopimattomissa olosuhteissa. Opinnäytetyössä saatuja tuloksia voitaisiin käyttää osana tieteellistä julkaisua tai ainakin jatkokokeiden suunnittelemista varten.

Opinnäytetyön aihe valittiin yhdessä tutkimusryhmän johtajan, professori Markku Kulomaan ja filosofian tohtori Vesa Hytösen, sekä työn ohjaajien filosofian tohtori Juha Määtän, että filosofian maisteri Soili Hiltusen kanssa muutamasta ehdotetusta vaihtoehdosta, josta muokattiin opinnäytetyöksi sopiva kokonaisuus. Aihe vaikutti kiinnostavalta ja haastavalta, muttei kuitenkaan teorialähtökohdiltaan liian abstraktilta. Aihepiiri oli kiinnostava, sillä tutkimuksessa käytettiin monenlaisia laitteita ja menetelmiä. Työskentely osana tutkimusryhmää tarjosi myös uutta ja tärkeää ryhmätyöskentelykokemusta.

Tutkimukseen liittyi sopivasti sekä uusien tekniikoiden opettelua, että vanhojen taitojen kartuttamista, mikä osaltaan piti motivaation aiheeseen ylhäällä. Lisäksi saadut oletuksien mukaiset tulokset motivoivat jatkamaan tutkimuksessa eteenpäin. Lisäksi mahdollisuus vaikuttaa itse opinnäytetyön valintaan ja sisältöön motivoi tutkimuksen tekemistä. Vaikka ITC-kokeet eivät onnistuneet täydellisesti, tuli kokeiden lomassa opittua aiemmin tuntematon menetelmä. Lisäksi tutkimuksen aikana vastaan tuli uusia toimintatapoja alalta sekä mahdollisuuksia päästä soveltamaan aiempaa tietämystä. Kaiken kaikkiaan opinnäytetyöprosessi oli erittäin mielenkiintoinen kokeelliselta osaltaan.

Tutkimusryhmässä työskentely oli minulle täysin uutta, mistä syystä sen kaikkea potentiaalia en välttämättä pystynyt kerralla hyödyntämään. Esimerkiksi juuri ryhmän avulla työskentelyä olisi pitänyt hyödyntää enemmän, sen sijaan että mietin ja tein hyvin paljon asioita itse.

Kirjallisessa osassa todella perehdyin siihen, kuinka menetelmät ja asiat teoriassa toimivat. Kirjallisen osan aikana sain selvyyttä aiemmin abstraktilta kuulostaviin kokonaisuuksiin ja opin paljon tutkimuksen kohteena olleesta proteiinista, sekä käytettävien menetelmien teoriasta. Käytännön tekemisen oppiminen teoriassa sai minut hankkimaan käsitellyistä asioista runsaasti tietoa ja koen oppineeni tutkimuksen tekemisestä prosessina todella paljon. Vaikka lähdeteksti oli hieman vaikeaa luettavaa tietyillä osa-alueilla, oli käytännön tekeminen saanut ymmärtämään aikaisemmin vaikeasti hahmotettavia asioita.

LÄHTEET

- Allen, W. 1935. The Isolation of Crystalline Progesterone. *Science*. 82. 89–93.
- Amersham Pharmacia Biotech. 2001. Affinity Chromatography. Principles and Methods. Handbook. 18-1022-29.
- Baneyx, F. 1999. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10. 411–421.
- Bayer, E. ja Wilchek, M. 1990. Application of Avidin-Biotin Technology to Affinity-Based Separations. *Journal of Chromatography*. 510. 3–11.
- Benz, I. ja Schmidt, M. Never Say Never Again: Protein Glycosylation in Pathogenic Bacteria. *Molecular Biology*. 45 (2). 267–276.
- Bruch, R. ja White, H. 1982. Compositional and Structural Heterogeneity of Avidin Glycopeptides. *Biochemistry*. 21 (22). 5334.
- Butenandt, A. ja Westphal, U. 1934. Zur Isolierung und Charakterisierung des Corpusluteum-Hormons. *Berichte Deutsche chemische Gesellschaft*. 67. 1440–1442.
- Butenandt, A. ja Hanisch, G. 1935a. Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol und Testosterone; ein Weg zur Darstellung des Testosterons aus Cholestrin. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie*. 237 (2). 89–97.
- Butenandt, A. ja Hanisch, G. 1935b. Über die Umwandlung des Dehydroandrosterons in Androstendiol-(17)-one-(3) (Testosterone); ein Weg zur Darstellung des Testosterons auf Cholesterin (Vorlauf Mitteilung). *Chemische Berichte*. 68. 1859–1862.
- Campbell, M. ja Farrell, S. 2008. *Biochemistry*. 6. painos. USA, Kalifornia: Brooks/Cole.
- Cell Disruption & The French Press. nd. Thermo Scientific. Luettu 11.10.2011. http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_12736.pdf.
- Chalet, L., Miller, T., Tausig, F. ja Wolf, F. 1963. Separation and Purification of Synergistic Components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 3. 28–32.
- Cornelis, P. 2000. Expressing Genes in Different *Escherichia coli* Compartments. *Current Opinion on Biotechnology* 11 (5). 450–454.
- Darnton, N., Turner, L. Rojevsky, S. ja Berg, H. 2007. On Torque and Tumbling in Swimming *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 189 (5). 1756–1764.
- David, K., Dingemans, E., Freud, J. ja Laqueur, E. 1935. Über krystallinisches männliches Hormon aus Hoden (Testosteron) wirksamer als aus Harn oder aus Cholesterin bereitetes Androsteron. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie*. 233 (5–6). 281–283.
- DeLange, R. ja Huang, T-S. 1971. Egg White Avidin. III. Sequence of the 78-Residue Middle Cyanogen Bromide Peptide. Complete Amino Acid Sequence of the Protein Subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 246 (3). 698–709.
- Donovan, J. ja Ross, K. 1973. Increase in the Stability of Avidin Produced by Binding of Biotin. A Differential Scanning Calorimetric Study of Denaturation by Heat. *Biochemistry*. 12 (3). 512–517.

- Du Vigneaud, V., Hoffman, K. ja Melville, D. 1942. On the Structure of Biotin. *Journal of the American Chemical Society*. 64 (1). 188–189.
- Eakin, R., Snell, E. ja Williams, R. 1940. A Constituent of Raw Egg White Capable of Inactivating Biotin *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*. 136. 801–802.
- Elo, H. 1980. Occurrence of Avidin-Like Biotin-Binding Capacity in Various Vertebrate Tissues and its Induction by Tissue Injury. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 67 (2). 221–224.
- Encyclopaedia Britannica. 2011. Luettu 24.10.2011.
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/192351/E-coli>.
- Farrell, S. ja Ranallo, R. *Experiments in Biochemistry*. 2000. A Hands-on Approach. Australia: Thomson Learning.
- Fotadar, U., Zaveloff, P. ja Terracio, L. 2005. Growth of *Escherichia coli* at Elevated Temperatures. *Journal of Basic Microbiology*. 45 (5). 403–404.
- Fraenkel-Conrat, H., Snell, N. ja Ducay, E. 1952. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 8 (39). 97.
- Gel Filtration. 2010. Principles and Methods. GE Healthcare. Handbook 18-1022-18.
- Gitlin, G., Bayer, E. ja Wilchek, M. 1987. Studies on the Biotin-Binding Site of Avidin. Lysine Residues Involved in the Active Site. *Journal of Biochemistry*. 242. 923–926.
- Gitlin, G., Bayer, E. ja Wilchek, M. 1988. Studies on the Biotin-Binding Site of Streptavidin. Tryptophan Residues Involved in the Active Site. *Journal of Biochemistry*. 256. 279–282.
- Gitlin, G., Bayer, E. ja Wilchek, M. 1990. Studies on the Biotin-Binding Site of Avidin and Streptavidin. Tyrosine Residues Involved in the Active Site. *Journal of Biochemistry*. 269. 527–530.
- González, M., Argaraña, C. ja Fidelio, G. 1999. Extremely High Thermal Stability of Streptavidin and Avidin upon Biotin Binding. *Biomolecular Engineering* 16. 67–72.
- Green, N. 1963a. Avidin. 1. The Use of [¹⁴C]Biotin for Kinetic Studies and for Assay. *Journal of Biochemistry*. 89. 585–591.
- Green, N. 1963b. Avidin. 3. The Nature of the Biotin-Binding Site. *Journal of Biochemistry*. 89. 599–609.
- Green, N. 1963c. Avidin. 4. Stability at Extremes of pH and Dissociation into Sub-Units by Guanidine Hydrochloride. *Journal of Biochemistry*. 89. 609–620.
- Green, N. ja Toms, E. 1973. The Properties of Subunits of Avidin Coupled to Sepharose. *Journal of Biochemistry*. 133. 687–700.
- Green, N. 1975. Avidin. *Advances in Protein Chemistry*. 29. 85–133.
- György, P., Melville, D., Burk, D. ja du Vigneaud, V. 1940. The Possible Identity of Vitamin H with Biotin and Coenzyme R. *Science*. 91. 243–245.
- Hartmann, M. ja Wettstein, A. 1934. Ein krystallisiertes Hormon aus Corpus luteum. *Helvetica Chimica Acta*. 17. 878–882.
- Held, P. 2008. Measure Your Purity. Assessment of Nucleic Acid Purity via UV-Absorbance. *G.I.T. Laboratory Journal*. 05–06. 9–11.

- Hertz, R. ja Sebrell, W. 1942. Occurrence of Avidin in the Oviduct and Secretions of the Genital Tract of Several Species. *Science*. 96. 257.
- Hiller, Y., Gershoni, J., Bayer, E. ja Wilchek, M. 1987. Biotin Binding to Avidin. Oligosaccharide Side Chain Not Required for Ligand Association. *Journal of Biochemistry*. 248. 167–171.
- HisTrap Affinity Columns. 2009. HisTrap FF crude, 1 ml and 5 ml. GE Healthcare. Instructions 11-0012-38 AF.
- Hiltunen, S., Tullila, A., Riihimäki, T., Määttä, J., Kulomaa, M., Takkinen, K., Nevanen, T. ja Hytönen, V. Käsikirjoitus valmisteilla. Automated Panning on Microplates: An Efficient Selection Method for Avidin Scaffold-Based Binding Proteins. Väitöskirja. Arvioitu valmistumisaika: joulukuu 2013.
- Hytönen, V., Laitinen, O., Airene, T., Kidron, H., Meltola, N., Porkka, E., Hörhä, J., Paldanius, T. Määttä, J., Nordlund, H., Johnson, M., Salminen, T., Airene, K., Ylä-Herttuala, S. ja Kulomaa M. 2004. Efficient Production of Active Chicken Avidin Using a Bacterial Signal Peptide in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*. 384. 385–390.
- Hytönen, V., Määttä, J., Nyholm, T., Livnah, O., Eisenberg-Domovich, Y., Hyre, D., Nordlund, H., Hörhä, J., Niskanen, E., Paldanius, T., Kulomaa, T., Porkka, E., Stayton, P., Laitinen, O. ja Kulomaa, M. 2005a. Design and Construction of Highly Stable, Protease-Resistant Chimeric Avidins. *Journal of Biochemistry*. 280. 10228–10233.
- Hytönen, V., Nordlund, H. Hörhä, J. Nyholm, T., Hyre, D. Kulomaa, T. Porkka, E., Marttila, A. Stayton, P. Laitinen, O. ja Kulomaa, M. 2005b. Dual-Affinity Avidin Molecules. *Proteins*. 61. 597–607.
- Hytönen, V. 2011. Henkilökohtainen tiedonanto. Filosofian tohtori. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. Proteiinidynamiikan tutkimusryhmä.
- Höhne, G., Hemminger, W. ja Flammersheim, H.-J. 2003. Differential Scanning Calorimetry. 2. painos. Saksa: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Invitrogen. 2010a. BL21-AI™ One Shot® Chemically Competent *E. coli*. User Manual.
- Invitrogen. 2010b. Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits. User Manual.
- Jelesarov, I. ja Bosshard, H. 1999. Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry as Complementary Tools to Investigate the Energetics of Biomolecular Recognition. *Journal of Molecular Recognition*. 12. 3–18.
- Keinänen R., Wallen M., Kristo P., Laukkanen M., Toimela T., Helenius M. ja Kulomaa M. (1994) Molecular Cloning and Nucleotide Sequence of Chicken Avidin-Related Genes 1–5. *European Journal of Biochemistry*. 220. 615–621.
- Laitinen, O., Hytönen, V. Nordlund, H. ja Kulomaa, M. 2006. Genetically Engineered Avidins and Streptavidins (Review). *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63. 2992–3017.
- Leppiniemi, J., Määttä, J., Hammaren, H., Soikkeli, M., Laitaoja, M., Jänis, J., Kulomaa M. ja Hytönen, V. 2011. Bifunctional Avidin with Covalently Modifiable Ligand Binding Site. *PLoS ONE*. 6 (1). e16576. 1–11.
- Lesch, H., Kaikkonen, M., Pikkarainen, J. ja Ylä-Herttuala, S. 2010. Avidin-Biotin Technology in Targeted Therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 7 (5). 551–564.

- Livnah, O., Bayer, E., Wilchek, M. ja Sussman, J. 1993. Three-Dimensional Structures of Avidin and the Avidin-Biotin Complex. *Biochemistry. Proceedings of the National Academy of Science USA*. 90. 5076–5080.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky L., Matsudaira, P., Baltimore, D. ja Darnell, J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4. painos. USA, New York: W. H. Freeman.
- McMurry, J. ja Simanek, E. 2007. *Fundamentals of Organic Chemistry*. 6. painos. Australia: Thomson.
- Melamed, M. ja Green, N. 1963. Avidin. 2. Purification and Composition. *Journal of Biochemistry*. 89. 591–599.
- MicroCal Inc. 2008a. GE Healthcare. Technology. What is DSC? Luettu 05.10.2011. <http://www.microcal.com/technology/dsc.asp>.
- MicroCal Inc. 2008b. GE Healthcare. Technology. What is ITC? Luettu 05.10.11. <http://www.microcal.com/technology/itc.asp>.
- Millipore. 2009. Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices User Guide.
- Määttä, J., Eisenberg-Domovich, Y., Nordlund, H., Hayouka, R., Kulomaa, M., Livnah, O. ja Hytönen, V. 2011. Avidin Shows Stability Against Harsh Chemical Conditions--Biochemical Analysis and 3D Structure. *Biotechnology and Bioengineering*. 108 (3). 481–490.
- Määttä, J. 2011. Henkilökohtainen tiedonanto. Filosofian tohtori. Tampereen yliopisto. Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. Proteiiniidynamiikan tutkimusryhmä.
- Nordlund, H., Hytönen, V., Laitinen, O. ja Kulomaa, M. 2005. Novel Avidin-Like Protein From A Root Nodule Symbiotic Bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *the Journal of Biological Chemistry*. 280 (14). 13250–13255.
- Nordlund, H., Laitinen, O., Uotila, S., Nyholm, T., Hytönen, V., Slotte, J. ja Kulomaa, M. 2002. Enhancing the Thermal Stability of Avidin. *The Journal of Biological Chemistry*. 278 (4). 2479–2483.
- Pierce NBT/BCIP Substrates and Solutions. 2011. Thermo Scientific. Pierce Protein Research Products. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01041003>.
- Polymer Science Learning Center. 2005. Department of Polymer Science. The University of Southern Mississippi. <http://pslc.ws/macrog/dsc.htm>.
- Protein Gel Stains. 2011. Thermo Scientific. Pierce Protein Research Products. <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=B06FFE8F-5056-8A76-4E15-AF49E5F5A91F#coomassiedyetotalproteininstains>.
- Pugliese, L., Coda, L., Malcovati, M. ja Bolognesi, M. 1993. Three-dimensional structure of the Tetragonal Crystal Form of Egg-white Avidin in its Functional Complex with Biotin at 2.7Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*. 231. 698–710.
- Riihimäki, T., Hiltunen, S., Rangl, M., Nordlund, H., Määttä, J., Ebner, A., Hinterdorfer, P., Kulomaa, M., Takkinen, K. ja Hytönen, V. 2011. Modification of the Loops in the Ligand-Binding Site Turns Avidin into a Steroid-Binding Protein. *BMC Biotechnology*. 11 (64). 1–11.
- Rosano, C., Arosio, P. ja Bolognesi, M. 1999. The X-Ray Three-Dimensional Structure of Avidin. *Biomolecular Engineering*. 16. 5–12.

- Ross, S., Carson, S. ja Fink, L. 1986. Effects of Detergents On Avidin-Biotin Interaction. *BioTechniques*. 4 (4). 350–355.
- Ruzicka, L. ja Wettstein, A. 1935. Über die kristallinische Herstellung des Testikelhormons, Testosteron (Androsten-3-ol-17-ol). *Helvetica Chimica Acta* 18. 1264–1275.
- Sheehan, D. 1996. Protein Purification Protocols. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Methods. *Methods in Molecular Biology*. 59. 269–275.
- Slotta, K., Ruschig, H. ja Fels, E. 1934. Reindarstellung der Hormone aus dem Corpusluteum. *Berichte Deutsche chemische Gesellschaft*. 67. 1270–1273.
- Switzer, R. ja Garritty, L. 1999. Experimental Biochemistry. Theory and Exercises in Fundamental Methods. 3. painos. USA, New York: W.H. Freeman and Company.
- Van Holde, K., Johnson, C. ja Ho, S. Principles of Physical Biochemistry. USA, New Jersey: Prentice-Hall Inc.
- Wallen, M., Laukkanen M. ja Kulomaa, M. 1995. Cloning and Sequencing of the Chicken Egg-White Avidin-Encoding Gene and its Relationship with the Avidin-Related Genes Avr1-Avr5. *Gene*. 161. 205–209.
- Wei, R. ja Wright, L. 1964. Heat Stability of Avidin and Avidin-Biotin Complex and Influence of Ionic Strength on Affinity of Avidin for Biotin. *Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine*. 117. 341–344.
- Wildiers, E. 1901. Nouvelle substance indispensable au d'eloppement de la levure. *La Cellule*. 18. 313–332.
- Woolley, D. ja Longsworth, L. 1942. Isolation of an Anti-Biotin Factor from Egg White. *Journal of Biological Chemistry*. 142. 285–290.
- Yacko, M. 2004. The Field of Homogenizing. PROScientific.
<http://www.proscientific.com/Homogenizing.shtml>.

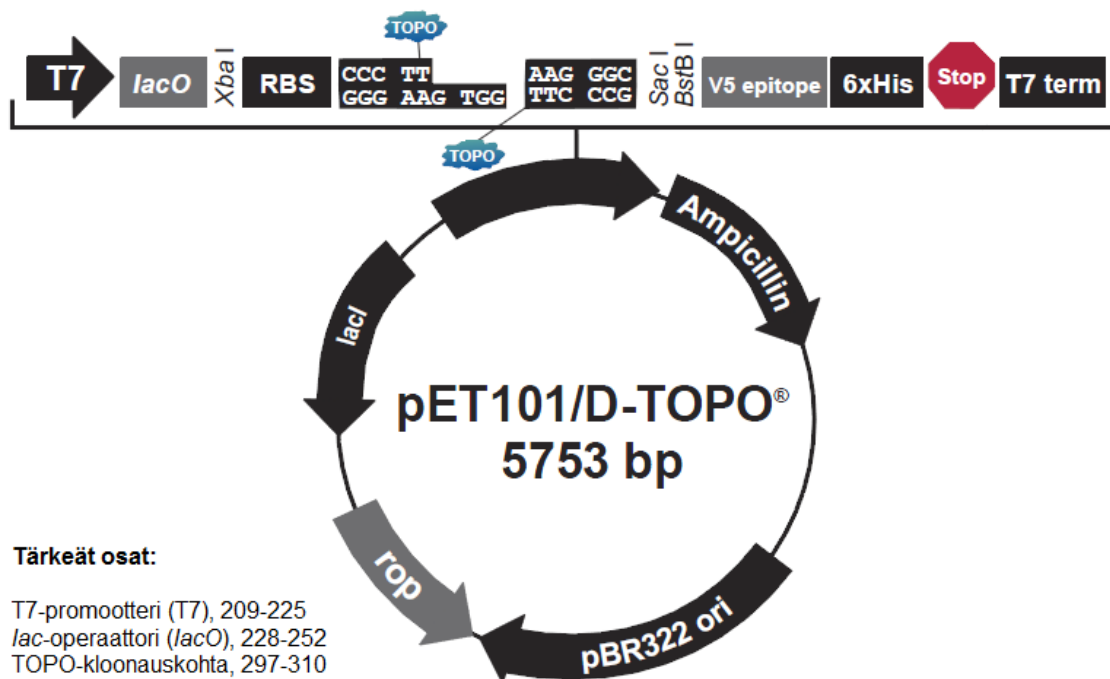
LIITTEET

LIITE 1. pET101/D-TOPO[®]-vektorikartta

LIITE 2. 15% SDS-PAGE-geelin valmistusohje

LIITE 3. Affiniteettipuhdistuskuvaajat tuotetuille proteiineille

LIITE 4. Proteiinikohtaiset titraatiokuvaajat eri ligandeilla

**Tärkeät osat:**

T7-promootteri (T7), 209-225
lac-operaattori (*lacO*), 228-252
 TOPO-kloonauskohta, 297-310
 Polyhistidiini-puhdistuskahva (6xHis), 384-401
 T7 transkription lopetuskohta (STOP), 416-544
 Ampisilliiniresistenssi (Ampicillin), 944-1804

KUVA 11. pET101/D-TOPO®-vektorikartta (Invitrogen 2010, 44, muokattu)

TAULUKKO 7. 15% SDS-PAGE-geelin valmistaminen

5 % konsentrinti-/ylägeeli (stacking gel) 5ml

3,4 ml H₂O

0,83 ml 30 % bisakryyliamidiseos

0,63 ml 1,0M Tris pH 6,8

0,05 ml SDS

0,05 ml 10 % ammoniumpersulfaatti

0,005 ml TEMED

polymerisoitumisaika 30 min

15% erottelu-/alageeli (resolving gel) 15ml

3,4 ml H₂O

7,5 ml 30 % bisakryyliamidiseos

3,8 ml 1,5M Tris pH 8,8

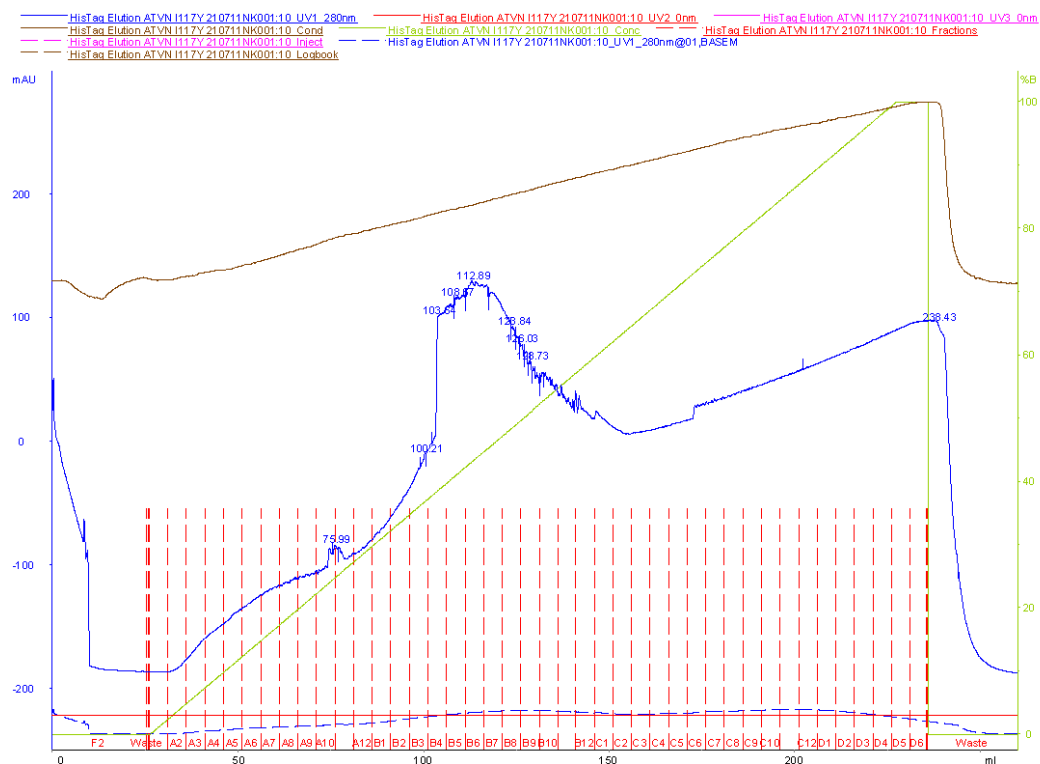
0,5 ml SDS

0,5 ml 10 % ammoniumpersulfaatti

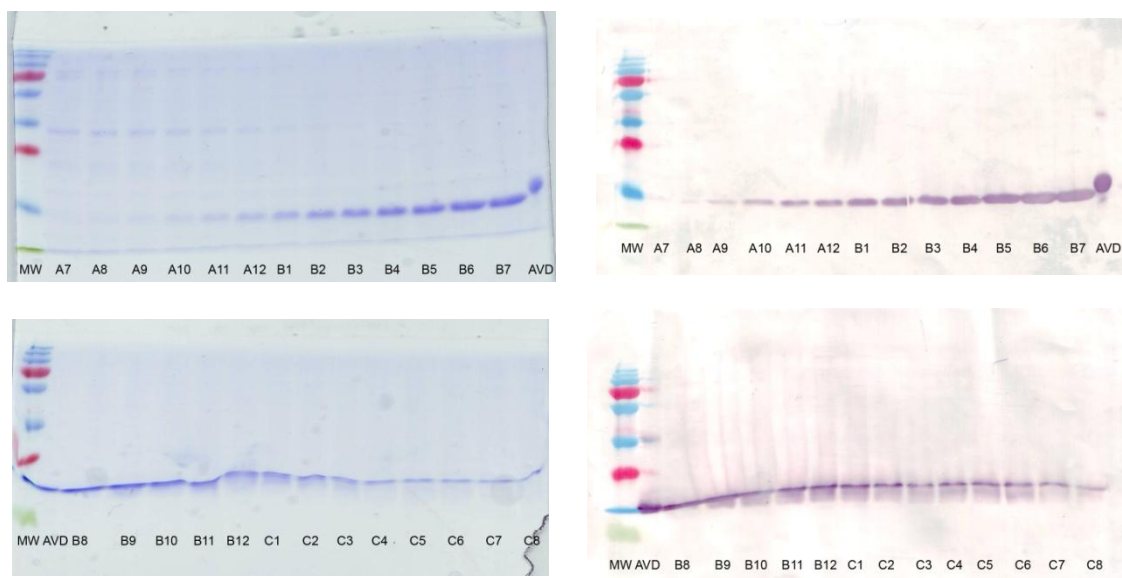
0,006 ml TEMED

alageelin päälle pipetoidaan ohut vesikerros kuivumisen estämiseksi

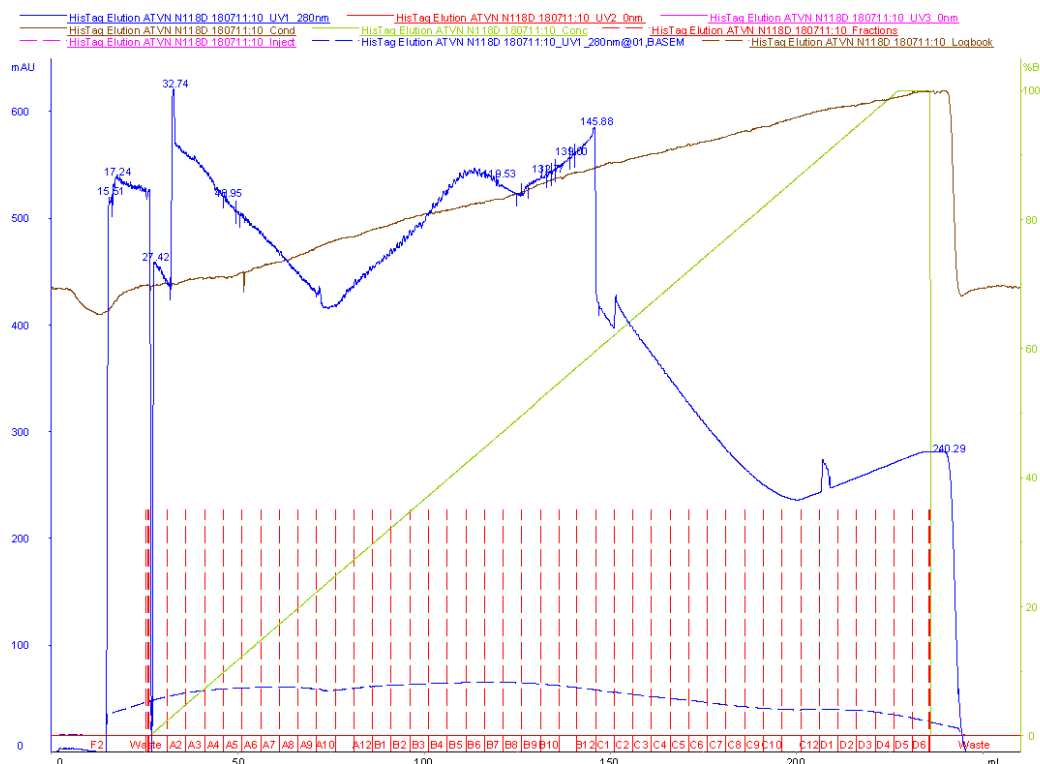
polymerisoitumisaika 30 min



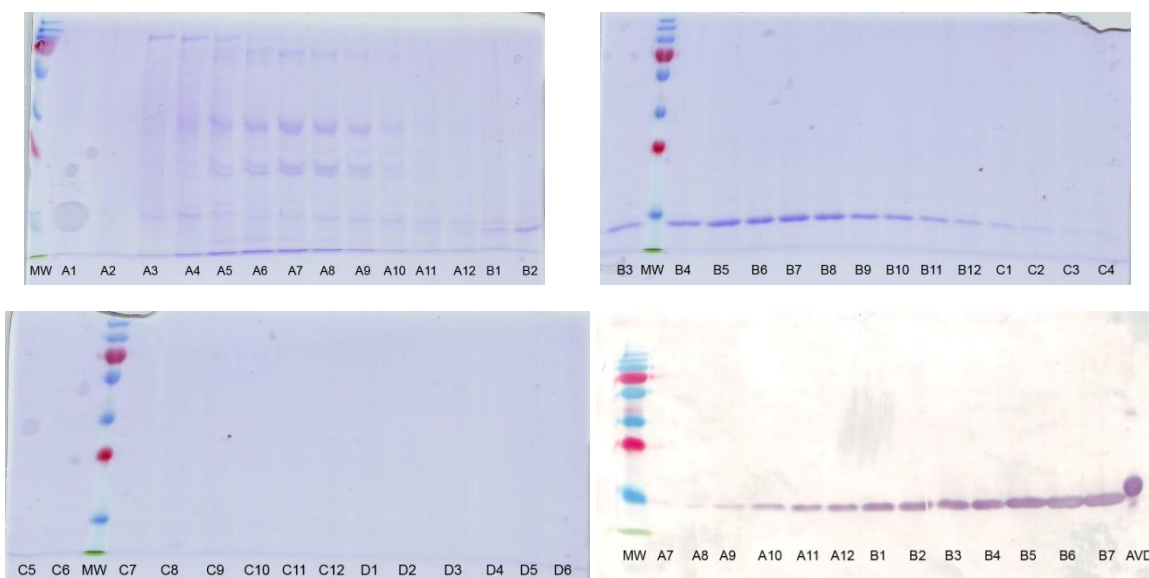
KUVIO 13. Nikkeli-sefaroosi-puhdistus ATVN+I117Y-konstruktille. Kuvaan merkityt suorat: imidatsoligradiendi (vaaleanvihreä), A280-mittaus proteiinille (sininen), eluutiofraktiot (punainen katkoviiva). Y-akselilla mitattu absorbanssi (mAU) ja x-akselilla eluutioon käytetty puskurimäärä (ml). Kuva Unicorn 5.2 -ohjelmasta (GE Healthcare).



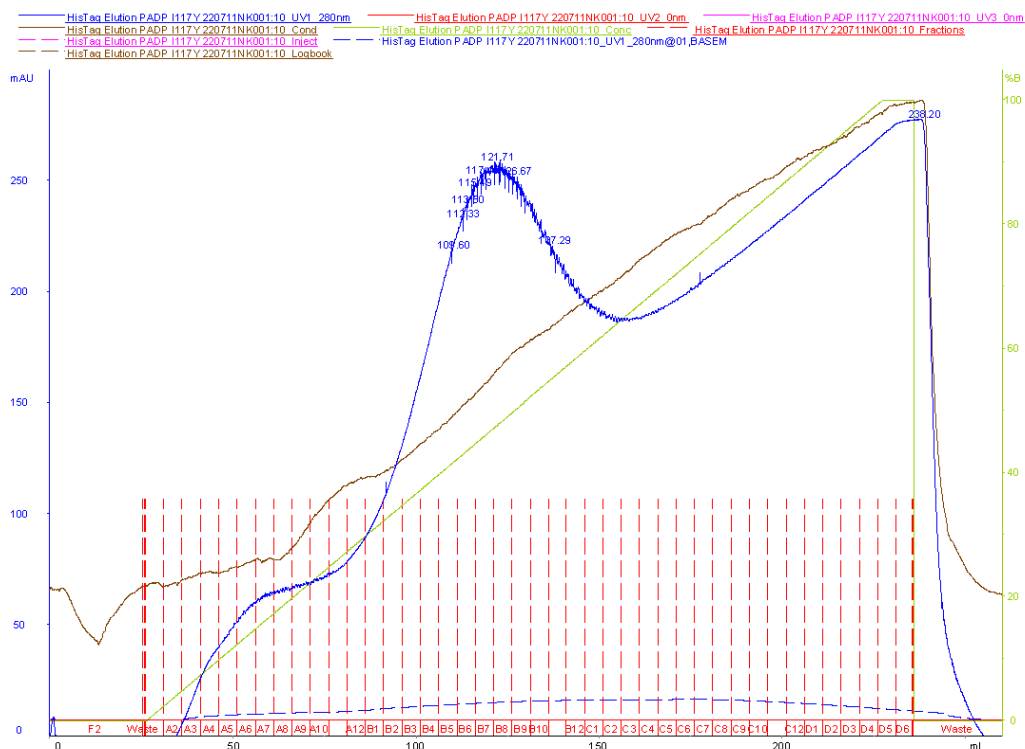
KUVA 12. ATVN+I117Y-konstruktin puhdistuksen fraktioista ajetut SDS-PAGE:t ja western blotit. Ylhäällä fraktiot A7-B7, alhaalla B8-C8. Fraktiot valittiin dialyysiin puhdistuskuvaajan (kuvio 13) piikin molemmiin puolin. Proteiini eluoituu puhtaana fraktiosta B2 eteenpäin ain viimeiseen analysoituun fraktioon asti. Dialyysiin valittiin fraktiot B4-B11 (8x5ml). (jatkuu)



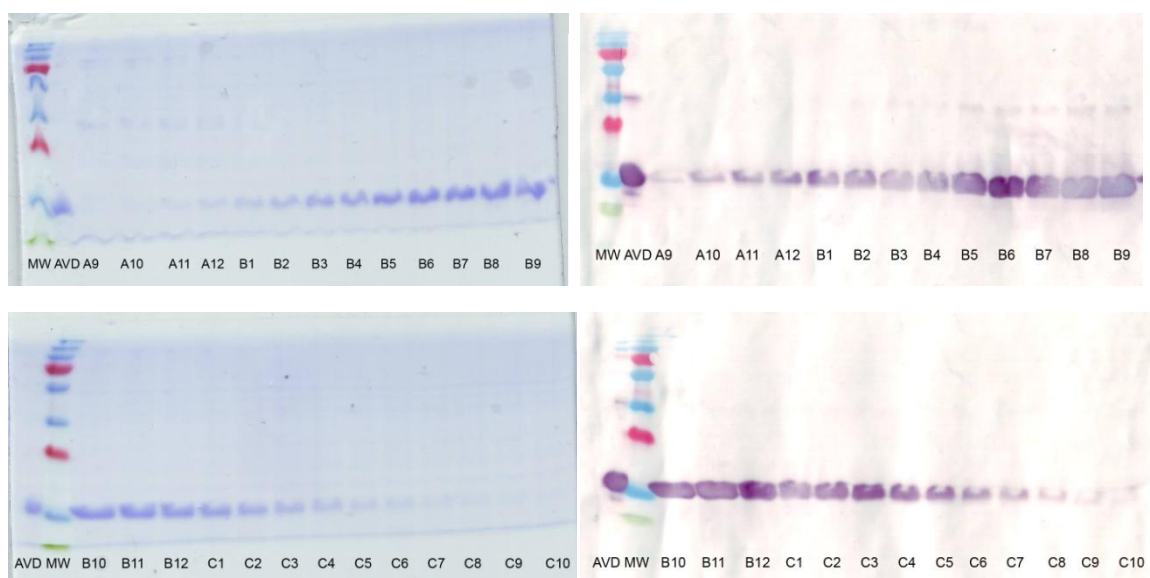
KUVIO 14. Nikkeli-sefaroosi-puhdistus ATVN+N118D-konstruktille. Kuvaan merkityt suorat: imidatsoligradiendi (vaaleanvihreä), A280-mittaus proteiinille (sininen), eluutiofraktiot (punainen katkoviiva). Y-akselilla mitattu absorbanssi (mAU) ja x-akselilla eluutioon käytetty puskurimäärä (ml). Kuva Unicorn 5.2 -ohjelmasta (GE Healthcare).



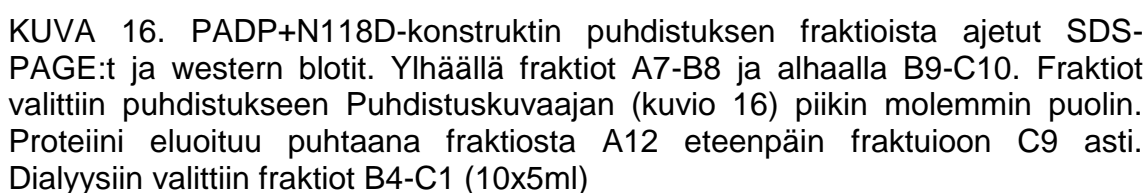
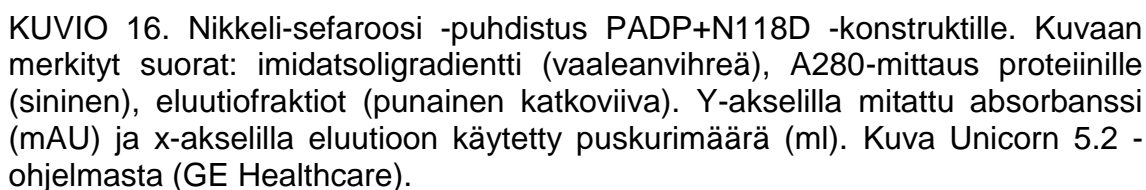
KUVA 13. ATVN+N118D-konstruktin puhdistuksen fraktioista ajettu SDS-PAGE:t ja western blotit. Geelit ajettu kaikista fraktioista ja western blotit ainoastaan fraktiosta A7-B7. Puhdistuksesta jouduttiin ajamaan kaikki fraktiot SDS-PAGE:lla, sillä kuvaajasta ei proteiinin eluoitumista voitu tulkita. Proteiini eluoituu puhtaana fraktiosta B1 eteenpäin fraktioon C2 saakka. Dialyysiin valittiin fraktiot B3-C10 (8x5ml). (jatkuu)



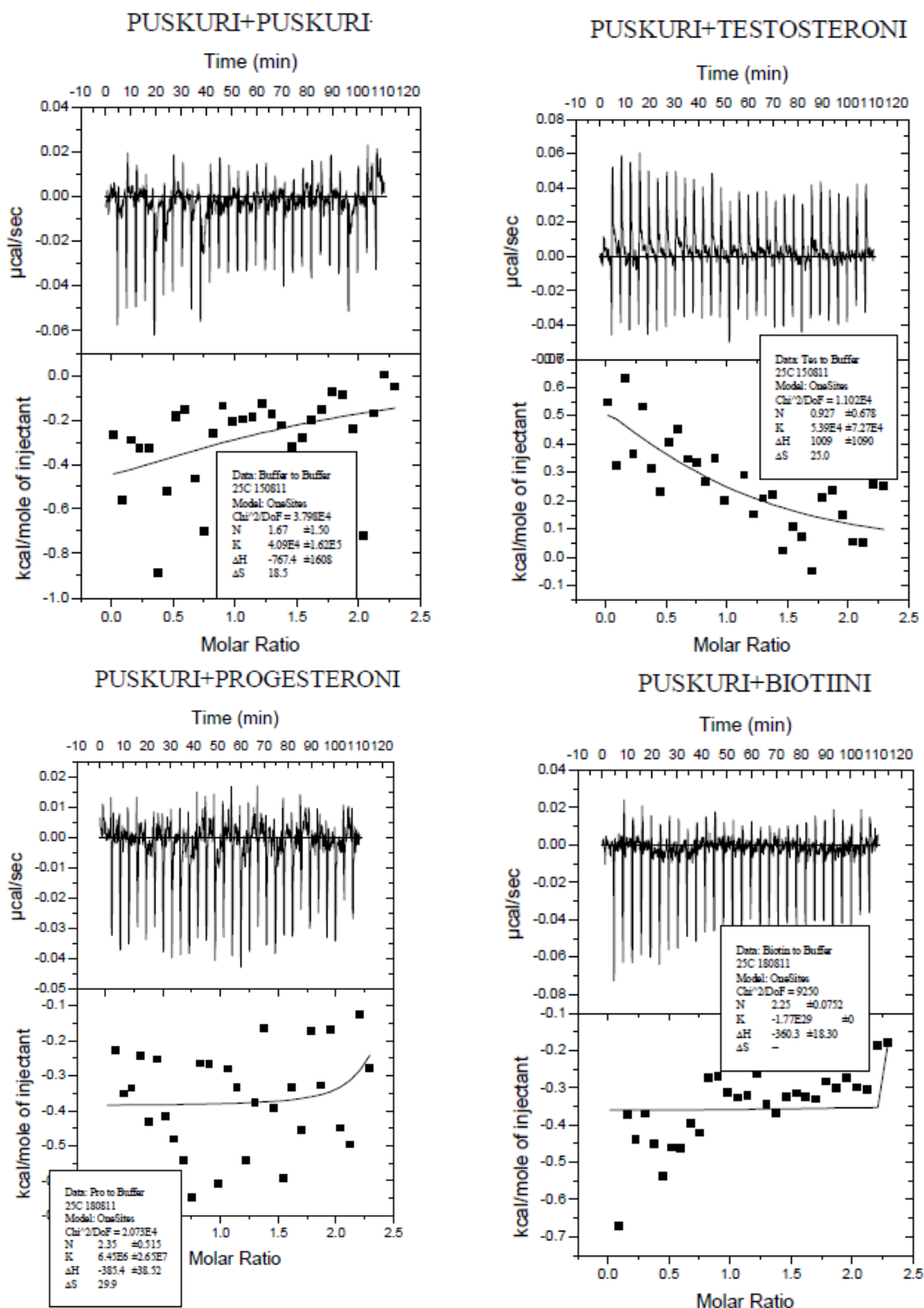
KUVIO 15. Nikkeli-sefaroosi-puhdistus PADP+I117Y-konstruktille. Kuvaan merkityt suorat: imidatsoligradiendi (vaaleanvihreä), A280-mittaus proteiinille (sininen), eluutiofraktiot (punainen katkoviiva). Y-akselilla mitattu absorbanssi (mAU) ja x-akselilla eluutioon käytetty puskurimäärä (ml). Kuva Unicorn 5.2 -ohjelmasta (GE Healthcare).



KUVA 14. PADP+I117Y-konstruktin puhdistuksen fraktioista ajettut SDS-PAGE:t ja western blotit. Ylhäällä fraktiot A9-B9 ja alhaalla B10-C10. Fraktiot valittiin dialyysiin puhdistuskuvaajan (kuvio 15) piikin molemmiin puolin. Proteiini eluoituu puhtaana fraktiosta B2 eteenpäin fraktioon C6 asti. Dialyysiin valittiin fraktiot B5-B12 (8x5ml). (jatkuu)

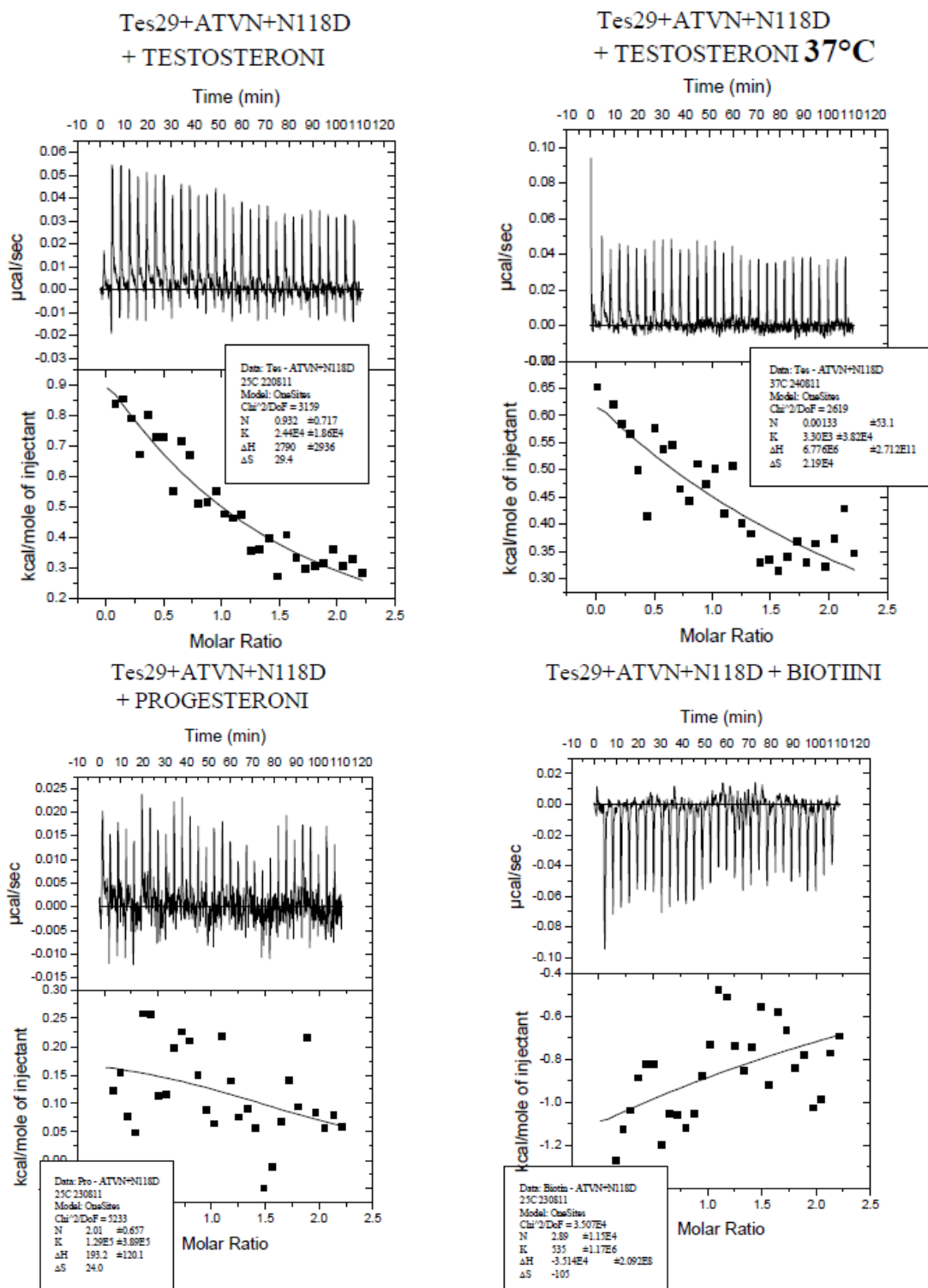


(jatkuu)



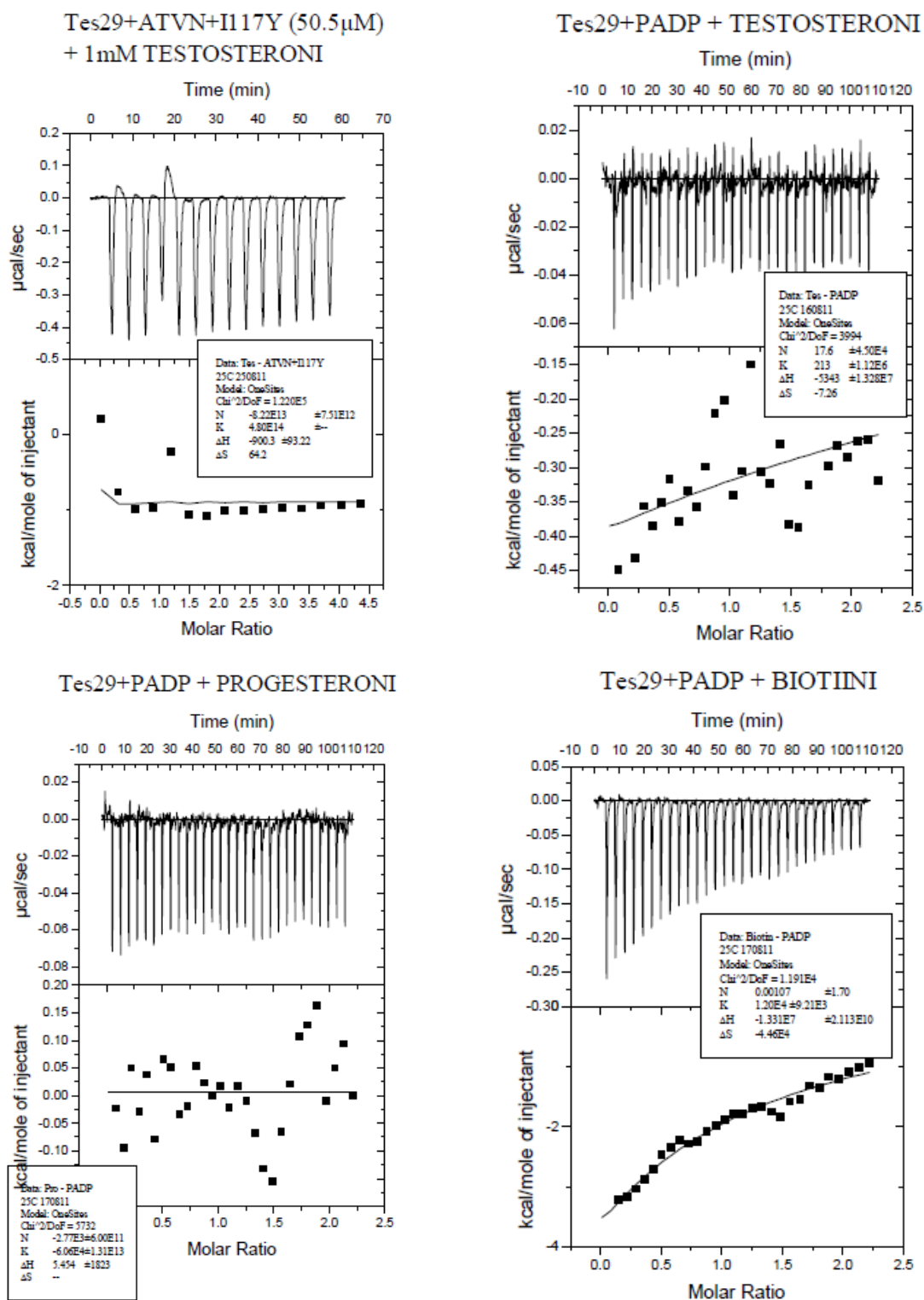
KUVIO 17. Kontrollien aiheuttamat signaalit titraatiokokeissa ja niistä piirretyt sitoutumiskuvaajat. Kontrollititraukset eivät näytä tuottavan korkeita signaaleja, joten muista kokeista voidaan havaita myös erittäin pienet signaalit.

(jatkuu)



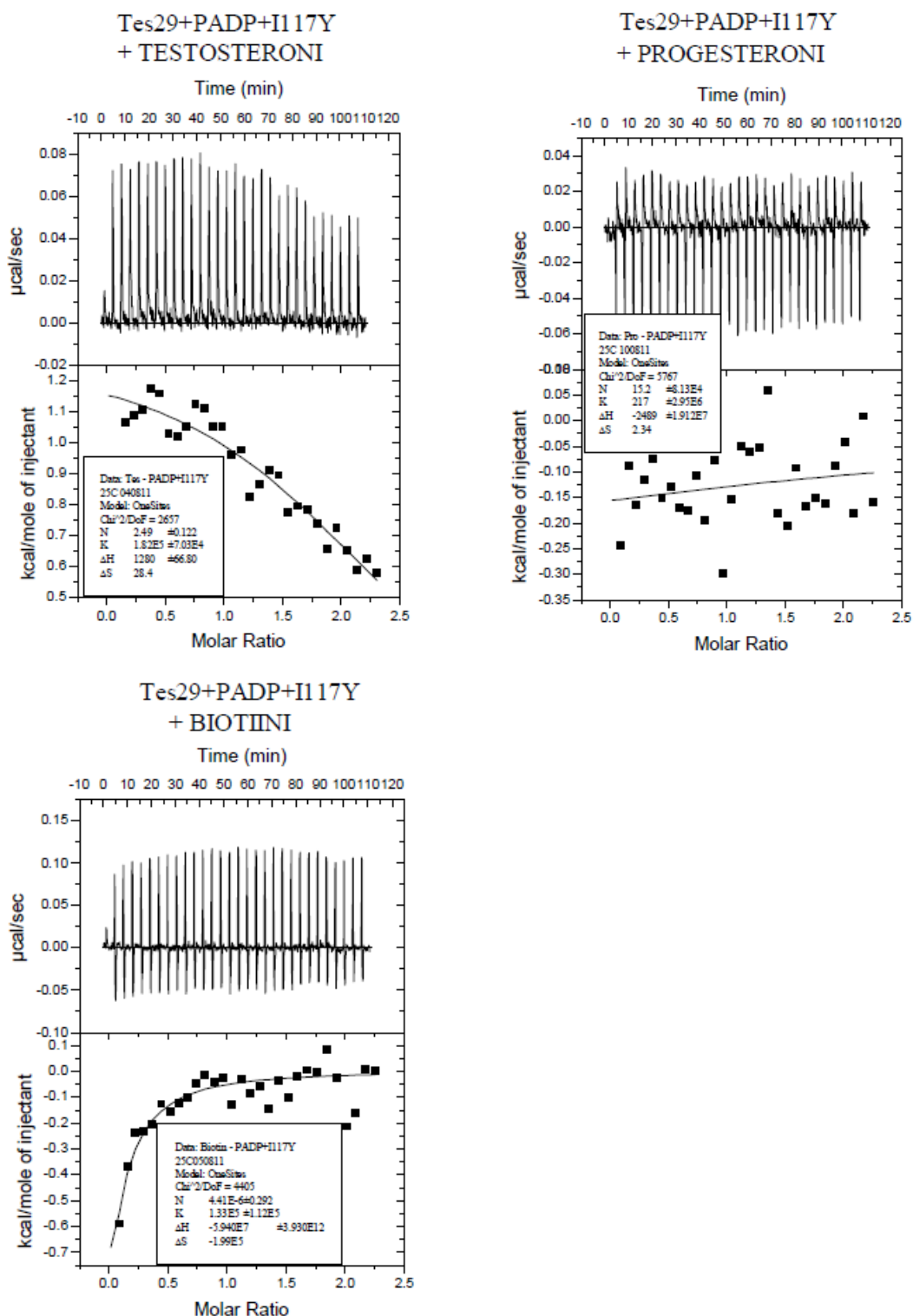
KUVIO 18. Titraussignaalit ATVN:n pistemutanttiin N118D. Testosteronin tai progesteronin sitoutumisesta ei saatu kokeilla varmuutta. Lämpötilan nosto ei vaikuttanut ligandin sitoutumiseen. Myös biotiinin sitoutuminen näyttää heikenneen pistemutaation myötä entisestään.

(jatkuu)



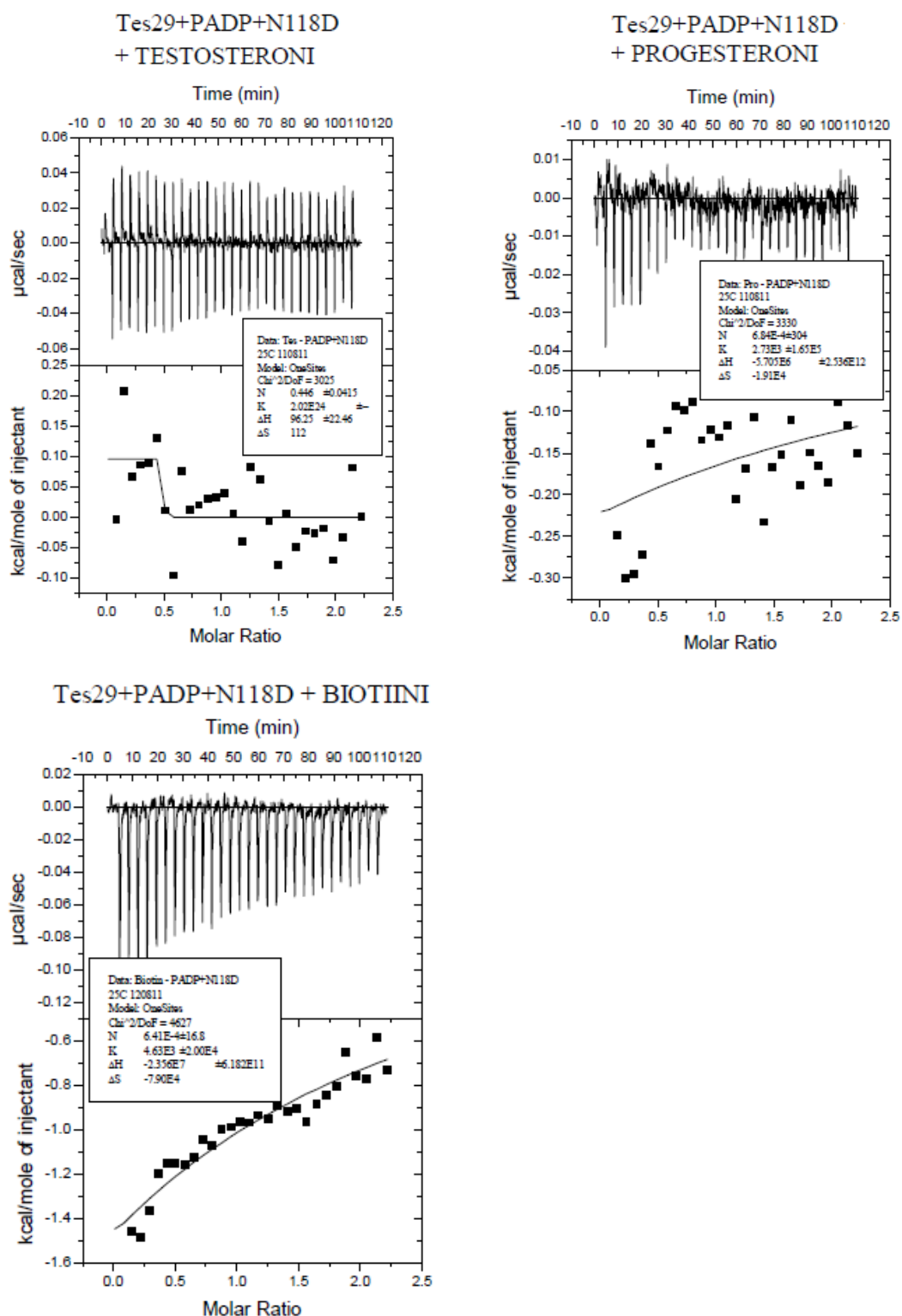
KUVIO 19. Titraussignaalit ATVN+I117Y ja PADP-mutanttiin eri ligandeilla ja niistä piirretyt sitoutumiskuvaajat. Saturaatiota ei saavuteta missään kokeista. Testosteronikonsentraation kasvattaminen ei vaikuttanut reseptorin saturaatioon ATVN+I117Y-mutantissa. PADP:n voidaan todeta vielä sitovan biotiinia, sillä signaali biotiinititrauksessa lähestyy saturaatiota. Biotiininsitominen on kuitenkin heikennyt huomattavasti PADP-mutaation myötä.

(jatkuu)



KUVIO 20. Titraussignaalit PAPD I117Y-pistemutanttiiin eri ligandeilla ja niistä piirretyt sitoutumiskuvaajat. Saturaatiota ei saavuteta missään kokeista. I117Y-mutantiiin affiniteetista mihinkään ligandiin ei saada varmuutta.

(jatkuu)



KUVIO 21. Titraussignaalit PADP N118D-pistemutanttiiin eri ligandeilla ja niistä piirretyt sitoutumiskuvaajat. Saturaatiota ei saavuteta missään kokeista. Affiniteetti biotiinia kohden on selvästi heikentynyt, mutta kuitenkin steroideja korkeampi. Steroidien sitoutuminen ei näytä lupaavalta.